EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

UNIVERSITY OF HAWAII LIBRARY
MAY 20 '58

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

R. T. Holman: The Separation of Fatty Acids 121

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

S. Deutsch, E. Picciotto et E. Niggli: Age des halos pléochroïques des granites de Baveno et Monte Orfano 128

S. Deutsch et E. Picciotto: Etude des halos pléochroïques dans le granite de Medel (Massif du St-Gothard) 128

G. F. Holland, B. Witkop, and S. L. Friess: Labilization of Ester Bonds in Aminodeoxyinositol Derivatives as Mediated by Molecular Conformation 129

K. Lang und K.-U. Hartmann: Phosphoribomutase- und 5-Phosphoriboisomerase-Aktivität in isolierten Zellkernen . . 130

S. J. Lundin: On the Location of Cholinesterase in Fishes . . 131

V. Bonavita and V. Scardi: The Interaction between Pyridoxal-5-Phosphate and Arginine Apodecarboxylase 133

Z. Dvořák: Breakdown of Adenine Nucleotides in Beef Muscle *post mortem* and its Relation to the Content of Ammonia . . 133

A. Gast: Über Pflanzenwachstumsregulatoren 134

B. Exer: Über Pflanzenwachstumsregulatoren 136

W. Roth: Substances régulatrices de la croissance végétale . . 137

A. Cestari, C. Rizzoli e M. A. Gliozzi: Metionina, etionina, colina nel metabolismo intermedio dei fibroblasti coltivati *in vitro* 138

D. E. Rounds and R. A. Flickinger: An Attempt to Transfer Tumor Protein Specificity to a Foreign Protein 139

J. Dietrich: Comportement nucléaire anormal dans la racine d'*Ornithogalum umbellatum* L. 139

J. F. Riley: Fluorescent Mast Cell in Precancerous Mouse Skin 141

Suzanne Bloch: Beobachtungen über Fälle von frühzeitiger Trächtigkeit bei der Albino-Maus 141

E. Dodt and J. B. Walther: Photopic Sensitivity Mediated by Visual Purple 142

Ch. Mayer und Ch. Stumpf: Bestimmung der optimalen Reizparameter bei Reizung des aszendierenden retikulären Systems 143

Lj. Mihailović, B. D. Janković, M. Petković, and K. Isaković: Effect of Electroshock upon Nucleic Acid Concentrations in Various Parts of Cat Brain 144

L. Decsi and J. Méhes: The Action of Tranquilizing Drugs on Brain Metabolism 145

J. Hladovec, V. Mansfeld, and Z. Horáková: Inhibitory Action of Trypsin and Trypsin-Inhibitors on Experimental Inflammation in Rats 146

U. Lanz und H. Thölen: Die Wirkung des 6-Allyl-6, 7-dihydro-5H-dibenz[c, e]azepins («Ilidar» Roche) auf die Glomerulardurchblutung des Kaninchens 148

A. Estève et J. Laporte: Hydrazide de l'acide cyanacétique et temps de saignement moyen chez le lapin 148

G. Schubert und H. Bornschein: Nachweis einer reflektorischen Natur der Jodazetat-Miosis 149

J. J. Chart, H. Sheppard, M. J. Allen, W. L. Bencze, and R. Gaunt: New Amphenone Analogs as Adrenocortical Inhibitors 151

M. Pospíšil and M. Hill: Stress Response of Leucocytes in Hypothyroid Rats 152

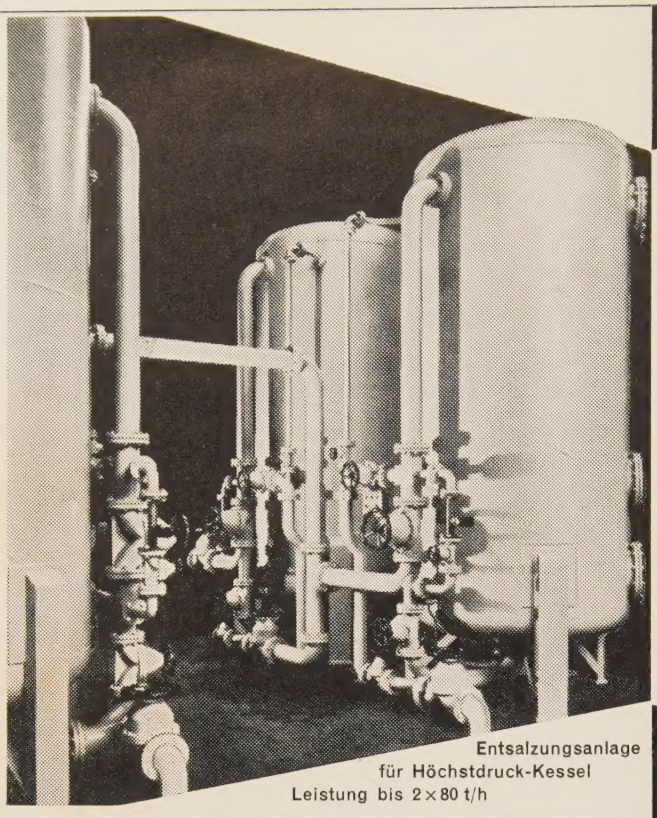
D. Arigoni: Zur Biogenese pentazyklischer Triterpene in einer höheren Pflanze 153

E. Heintz: Un dispositif sensible pour la mesure rapide d'attractions et de répulsions tropistiques chez des animaux grégaires (Pro Laboratorio) 155

E. Heintz: Mesure du chimiotropisme de poissons grégaires avec un nouveau dispositif sensible 156

N. Jonsson and S. Lagerstedt: Losses of Nucleic Acid Derivatives from Fixed Tissues during Flattening of Paraffin Sections on Water (Pro Experimentis) 157

E. A. De Felice: Adaptation of the Methyl Orange Method for the Determination of Reserpine (Pro Experimentis) . . 159



Entsalzungsanlage
für Höchstdruck-Kessel
Leistung bis 2×80 t/h

THEODOR CHRIST AG BASEL

Engelgasse 77 Telefon (061) 23 19 70

Über 250

Wasserentsalzungs-Anlagen liefern reinstes Wasser für

Höchstdruckkessel, chemische und pharmazeutische Industrie und viele andere Betriebe

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XIV/4

Ciba AG., Basel
Theodor Christ AG., Basel
Ganz & Co., Zürich
J. R. Geigy AG., Basel
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel
E. Mettler, Zürich
Sandoz AG., Basel
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH., Stuttgart

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:
Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de poste des pays suivants:

Italien	Belgien, Luxemburg	Dänemark	Schweden	Portugal
Deutschland	Holland	Norwegen	Finnland	Marokko

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 44.– pour la Suisse; pour l'étranger Fr. 56.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 44.–, im Ausland sFr. 56.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e puo esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 44.– per la Svizzera; all'estero sfr. 56.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 44.–; other countries sfr. 56.–. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

Copyright 1958 by Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 235820; Telegrammadresse: Edita Basel

Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

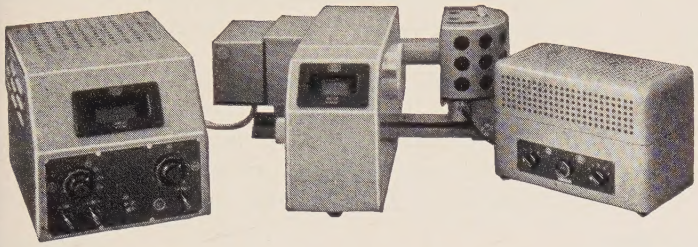
Das neue

ZEISS

Quarz-Spektralphotometer

PMQ II

erfüllt Ihre Wünsche!



Beachten Sie die Vorteile:

- **Direktanzeige** des Meßwertes (ohne Einbuße an Meßgenauigkeit), dadurch Übersicht über das Absorptionsspektrum und Zeitgewinn.
- **Vollständiger Netzbetrieb.** Keine Akkumulatorwartung; jederzeit betriebsbereit.
- **Impulslicht – Wechselstromverfahren.** Dunkelstromeinstellung fällt weg und ebenso der feuchtigkeitsempfindliche Gleichstromverstärker (keine Trocknungspatronen mehr).
- **Meßbereich:** 200–2500 mμ.
- **Höchste Empfindlichkeit** durch Sekundärelektronen-Vervielfacher 1P28 und PbS-Photo-Widerstand.
- **Einfach-Monochromator** mit Quarz- oder Glasoptik oder **Doppel-Monochromator** mit auswechselbarer Quarz- und Glasoptik nach Wunsch.
- **Mikroküvetten** mit nur 0,2 cm^3 Füllvolumen pro Zentimeter Schichtlänge.
- **Flammen-, Fluoreszenz-, Remissions- und Chromatogrammzusätze.**

Bitte verlangen Sie den ausführlichen Prospekt Nr. 05–657/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS

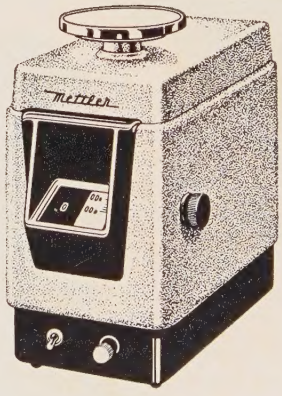
Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ & CO

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73

Zürich

E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich



Die modernen
Schnellwaagen
für Industrie
Gewerbe
und Handel

P 3

Als Geigy gegründet wurde...

1758

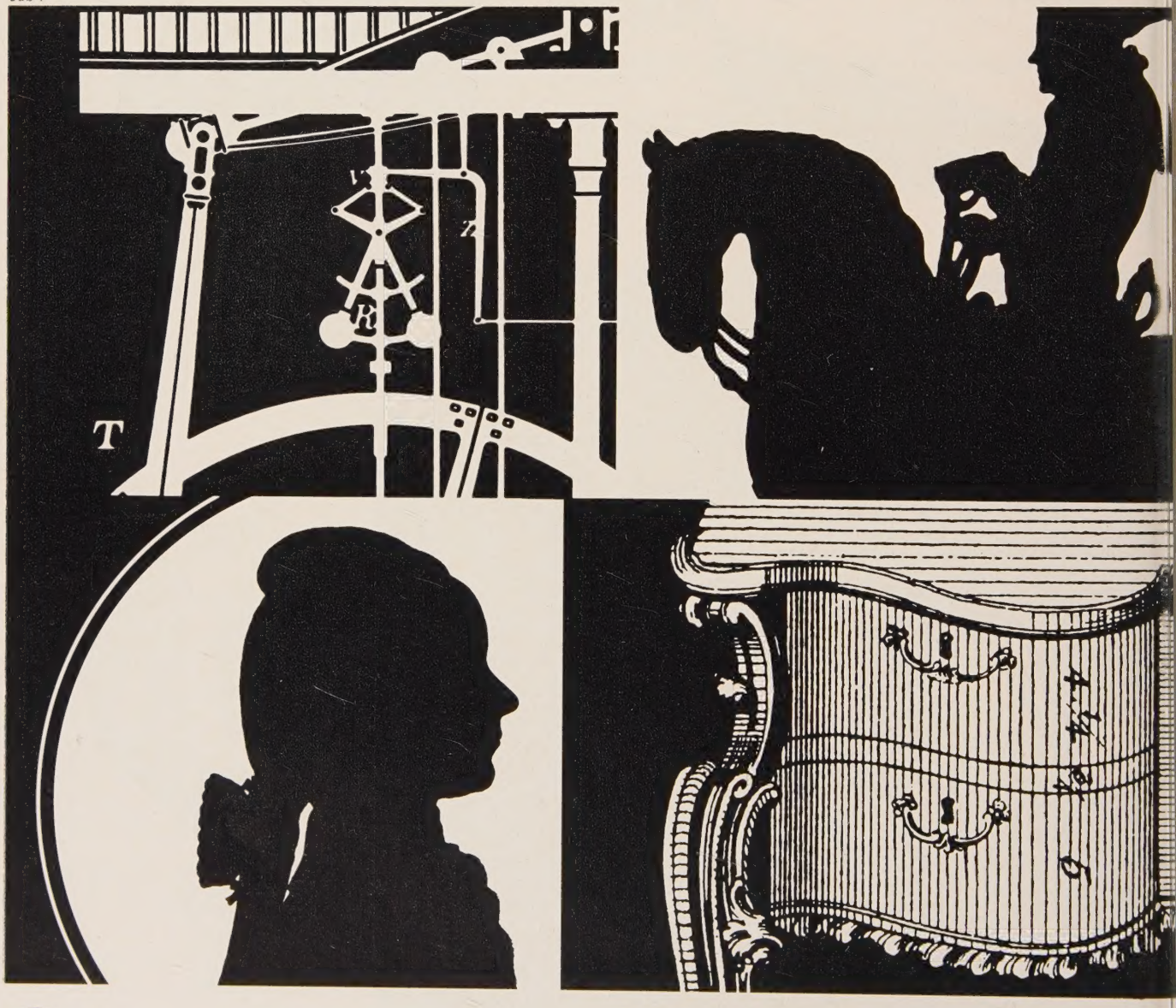
war Rokoko die Mode. In Versailles herrschte die Pompadour. Haydn komponierte, Voltaire und Rousseau schrieben, Goethe und Mozart waren noch Kinder.
Ein paar Jahre vorher hatte Benjamin Franklin den Blitzableiter erfunden, ein paar Jahre später baute James Watt die erste Dampfmaschine. Diderot und d'Alembert arbeiteten an der Enzyklopädie, die Universität von San Felipe, in Santiago de Chile, war zwei, die Börsen von Wien und Edinburgh waren fünf Jahre alt. Adam Smith bereitete seine nationalökonomische Lehre vor, England und Frankreich bekämpften sich um den Besitz der überseeischen Gebiete. Krieg herrschte auch zwischen Friedrich II. von Preussen und dem Oesterreich Maria Theresias. Porzellanmanufakturen wurden gegründet, der Zement war soeben erfunden worden, und der Tischler Chippendale hatte einen neuen Möbelstil geschaffen.

1758 wurde eines der ältesten Chemieunternehmen d Welt in der Stadt Basel als ein Geschäft in Chemikalie Farbwaren und pharmazeutischen Drogen gegründet. Der Name des Gründers war Johann Rudolf Geigy.

Heute, 200 Jahre später, feiert die J. R. Geigy A.G. in Bas zusammen mit den Geigy-Gesellschaften der ganzen Welt, das 200jährige Bestehen dieses Namens. Denn a dem ursprünglichen Kleinunternehmen ist unterdess eine in zahlreichen Ländern der Erde niedergelassene Gesellschaft geworden, deren Produkte, wie zum Beispiel die von Geigy geschaffenen DDT-Präparate od das Wollschutzmittel Mitin, überall bekannt sind.

Die Tätigkeit der Geigy-Gesellschaften erstreckt sich heute auf Farbstoffe, Pigmente und Gerbstoffe, industrielle Chemikalien und Plasticisers, Pharmazeutik und Schädlingsbekämpfungsmittel. Organische Chemikalien höchster Qualität tragen den Namen Geig

Jub 1



Geigy

J.R. Geigy A.G., Basel

200 Jahre **Geigy**

EXPERIENTIA

Vol. XIV - Fasc. 4 Pag. 121–160 15. IV. 1958

The Separation of Fatty Acids[1]

By Ralph T. Holman*

It is the purpose of this review to discuss methods which are currently being applied to the separation, analysis, and identification of fatty acids. In a brief presentation, it is impossible to treat all methods or to give examples of all techniques. The author has therefore chosen to outline the newer physical techniques and to give emphasis to those methods with which he has had some experience. Separations are performed either for preparative or for analytical purposes. Methods applicable for the one purpose may or may not be applicable for the other. Therefore, each method will be discussed from both points of view wherever possible.

It was but a short time ago that the chemist interested in lipides had at his disposal only a few crude techniques for the separation of their components. Most of the early methods for the separation of fatty acids depended upon the formation of derivatives which were poorly soluble in some solvent. The separation of 'saturated' and 'unsaturated' acids as their lead salts, the fractionation of lithium salts of unsaturated acids, and the isolation of linoleic and linolenic acids via the bromides depended upon chemical alterations of the fatty acids prior to separation. The common methods which attempted the measurement of individual fatty acids or groups were based largely upon chemical reactions. Thus, the determination of unsaturation by iodine value, of linoleic and linolenic acids by means of the thiocyanogen value, or saturated acids via oxidative procedures involved reactions by which the sample was essentially destroyed. The undiscriminating chemical methods were really group determinations, and no methods for the measurement of specific fatty acids were available.

Two physical methods earliest in use were fractional distillation and fractional crystallization. These have both grown in importance to fat chemistry and are indispensable today. Crystallization at low temperatures, carefully worked out by Brown and his students[2], proved to be a great improvement over the salt separations. Distillation separates acids according to differences in one set of molecular properties and crystallization according to another, and thus the two have supplemented each other.

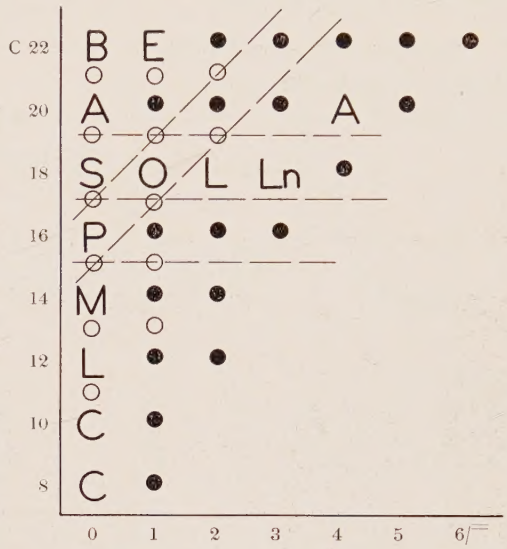


Fig. 1. — A simplified representation of the variety of naturally occurring fatty acids. The most abundant acids are represented by initials, less abundant acids by black circles, and branches and odd-numbered acids by open circles. Horizontal lines indicate separations by chain length (distillation) and diagonal lines represent possible separations by crystallization, chromatography, etc.

Before listing and discussing some modern separation procedures, it would be well to discuss the problem that faces the chemist. The naturally-occurring fatty acids differ by chain length and by degree of unsaturation. The problem is even more complex than was formerly thought, because odd-numbered and branched-chain acids have recently been found to be minor constituents of natural fats. Some of the complexity of the problem of separation can be illustrated by the chart shown in Figure 1. The most abundant acids are indicated by their initials. Less common acids are shown by solid circles. Some of the branched acids and acids of odd chain length have been indicated in the diagram by open circles. Isolation of a single acid thus requires a methodology which has a very high ability to discriminate.

Fractional distillation, usually carried out with the fatty acid esters, separates according to boiling point, a property related to the molecular weight. Ideally,

* The Hormel Institute and Department of Physiological Chemistry, University of Minnesota, Austin.

[1] Presented before the symposium on Chemistry and Physiology of Fats at the meeting of the Chemical Institute of Canada, Ottawa, October 9, 1957. Hormel Institute publication No. 168.

[2] J. B. Brown and D. K. Kolb, *Progress in the chemistry of fats and other lipids*, Vol. 3 (Ed. by R. T. Holman, W. O. Lundberg and T. Malkin, Pergamon Press, London-New York 1955), p. 57.

this method fractionates a mixture into groups which have a uniform chain length but branched fatty acids present in natural mixtures complicate the problem. This is represented in Figure 1 by horizontal zones. Crystallization separates according to solubility, which is influenced both by chain length and by unsaturation in the fatty acid series. In practice, this technique is used to make a rough separation of saturated acids from unsaturated acids, but in fact the liquors would contain considerable amounts of the short chain saturated acids, so the separation cannot be represented as a strictly vertical line in Figure 1. By the appropriate use of both types of fractionation, the intersection of the zones permits the isolation of individual components in reasonable purity.

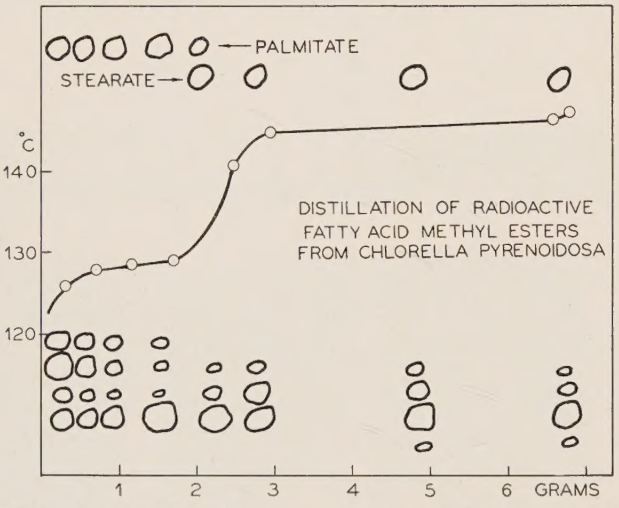


Fig. 2. — Fractional distillation of radioactive fatty acid methyl esters derived from Chlorella lipides using a spinning band column. Paper chromatograms of the fractions are shown below, and of hydrogenated fractions above. Redrawn from the data of Mangold and Schlenk[3].

A combination of distillation and crystallization is still the best means to prepare pure fatty acids in quantity. All methods for the preparation of more than a few grams of pure acid or ester must use these methods or variants of them. The weakness of these methods is that they are not readily applicable to separations of small samples such as is often necessary in the analysis of biological samples.

Equipment has been designed specifically for fractional distillation of long chain esters in quantities greater than 5 g, and modern apparatus can achieve surprisingly clean separations[4]. For fractional distillation of small amounts of esters the spinning band column has proven to be very efficient. Separation often is better than can be judged by examination of the curve of boiling points, because unsaturated esters predominate at the beginning, and saturated esters at the end of fractions of uniform chain length. An example[3] of fractional distillation in a spinning band column monitored by paper chromatography, is shown in Figure 2. The separation between 16 and 18 carbon acid esters is quite sharp, because fraction 5, the transition fraction, is the only one which contains esters of both chain lengths. The proportion of unsaturated esters is seen to decrease as the distillation of each chain length proceeds, and stearate appears only in the last two fractions.

Amplified distillation was introduced by Weitkamp as an attempt to reduce the amount of sample needed for a fractionation according to chain length[5]. The remarkable success with which he and his colleagues separated 32 component acids of wool wax indicates the potential of this technique of fractional distillation. A small sample of fatty acid esters is distilled with a much larger amount of hydrocarbon mixture, the boiling point of which has a smooth gradient spanning the range of boiling points of the esters. When the boiling point of each of the individual esters is reached, it distills with hydrocarbons of similar boiling point, and the individual esters are then spaced by large amounts of hydrocarbons. This method has not been generally adopted, perhaps because the recovery of fatty acids from a large amount of unsaponifiable matter is difficult.

Fractional crystallization at low temperatures is almost indispensable for the preparation of large amounts of fatty acids. Through systematic studies of the solubilities of acids and esters in a variety of solvents and in wider ranges of temperature, the scope of its applications is continually being extended. One inherent disadvantage of the method is the co-crystallization of fatty acids which leads to less perfect separations than solubility data would predict.

A modern variation on the theme of crystallization is fractionation of fatty acids and esters by urea complex fractionation[6]. When urea is allowed to crystallize in the presence of straight chain compounds, it crystallizes in a hexagonal form, incorporating the aliphatic substance within its crystal lattice. The tendency of saturated acids to form complexes is greater than that of unsaturated acids or branched substances, and therefore the formation of urea complexes from mixed fatty acids enriches the saturated components in the solid complex and the unsaturated and branched components in the liquor. Urea complex fractionations find their best use in preparative procedures, because the process is easily adapted to large quantities. In effect, by the use of urea, the

[3] H. K. Mangold and H. Schlenk, J. biol. Chem. *229*, 731 (1957).

[4] K. E. Murray, *Progress in the chemistry of fats and other lipids*, Vol. 3 (Ed. by R. T. Holman, W. O. Lundberg, and T. Malkin, Pergamon Press, London-New York 1955), p. 245.

[5] A. W. Weitkamp, A. M. Simljanic, and S. Rothman, J. Amer. chem. Soc. *69*, 1936 (1947).

[6] H. Schlenk, *Progress in the chemistry of fats and other lipids*, Vol. 2 (Ed. by R. T. Holman, W. O. Lundberg, and T. Malkin, Pergamon Press, London-New York 1954), p. 243.

temperatures needed for the separation of fatty acids by crystallization are raised from sub-zero to room temperature. Therefore, separations can be achieved without elaborate equipment.

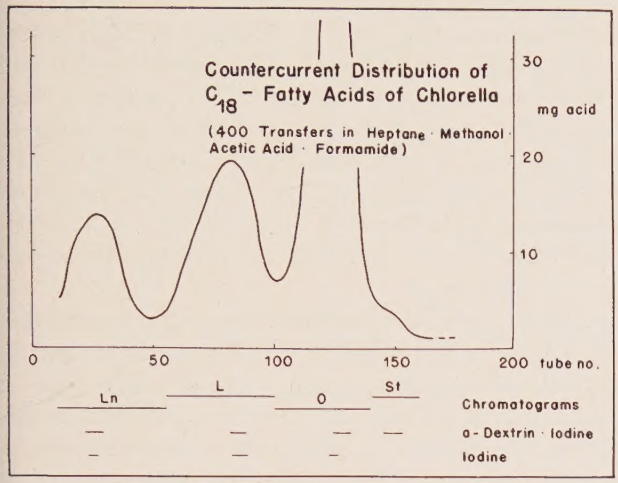


Fig. 3.—Countercurrent distribution of the 18-carbon fatty acids from Chlorella. Separations were monitored by spotting equal volumes on paper and developing with iodine and α-dextrin-iodine, indicating positions of the maxima. Paper chromatograms indicated the extent of each zone. From MANGOLD and SCHLENK[3].

Countercurrent distribution has been worked out in detail in the last decade for the separation of fatty acids[7]. In this technique, use is made of the differing solubilities of the fatty acids in two immiscible solvents. If a sufficient number of extractions is made, the fatty acids of a single chain length, but differing in unsaturation, can be separated from each other. Acids having the same degree of unsaturation and unequal chain lengths are also separable. In several careful investigations, the acids of 16, 18, and 20 carbon atoms having 1 to 5 double bonds have been isolated by this means. Figure 3 shows one such separation[8]. The 18-carbon acids of *Chlorella* fat were separated to obtain stearic, oleic, linoleic and linolenic acids. Countercurrent distribution equipment currently available allows the separation of samples ranging from milligrams to grams in a single run.

Chromatography is perhaps the most widely used general method for lipide and fatty acid separations[9]. In its broadest definition, chromatography is the separation of substances by virtue of the different concentrations of these substances in two phases which are in equilibrium and one of which is mobile. The stationary phase may be a liquid or a solid, and the mobile may be a liquid or a gas. The separation may be achieved by adsorption on a solid phase or partition between two fluid phases. The separation of homologs or of vinylogs can be easily achieved by chromatography on a microgram to a gram scale, but large scale preparations are not yet feasible by this method.

In most chromatographic methods, lengthening the carbon chain by two carbon atoms and introducing one additional double bond have opposite and almost equal effects upon the adsorptive properties of the fatty acids. Thus, acids lying on an approximately diagonal line running from lower left to upper right of Figure 1 will migrate very closely together. For example, palmitic and oleic acids are such an 'inseparable pair'. Therefore, and accurate analysis or an isolation by this method requires another separation according to chain length.

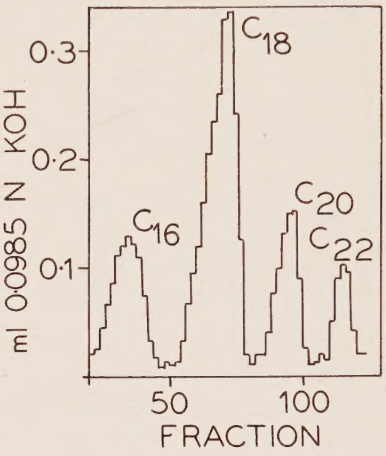


Fig. 4. – Separation of fatty acids by reversed phase column chromatography. The unsaturated fatty acids from depot fat of rats which chromatographed with linoleic acid were hydrogenated and chromatographed again. Zones were located by titration. MEAD[10].

Elution chromatography in columns is the original form of chromatography. However, it seems not to have been used as widely as other techniques for the separation of fatty acids. This method has been employed for the isolation of highly unsaturated fatty acids in a high state of purity. A very recent and illustrative example of the potency of the method is taken from the work of MEAD[10] and is shown in Figure 4. By reversed phase partition chromatography the unsaturated acids from the depot fat of rats were separated into groups. The group migrating with linoleic acid was hydrogenated and rechromatographed. The zones shown in Figure 4 thus are saturated acids which represent the palmitoleic, linoleic, arachidonic and docosapentaenoic acids originally present in the fatty acid mixture.

Displacement chromatography has been used for the separation of fatty acids, their esters, and other lipides[9]. In this form of adsorption chromatography, the column is developed by saturating it with a substance

[7] H. J. DUTTON, *Progress in the chemistry of fats and other lipids*, Vol. 2 (Ed. by R. T. HOLMAN, W. O. LUNDBERG, and T. MALKIN, Pergamon Press, London-New York 1954), p. 292.

[8] H. K. MANGOLD and H. SCHLENK (unpublished data).

[9] R. T. HOLMAN, *Progress in the chemistry of fats and other lipids*, Vol. 1 (Ed. by R. T. HOLMAN, W. O. LUNDBERG, and T. MALKIN, Pergamon Press, London-New York 1952), p. 104.

[10] J. F. MEAD, J. biol. Chem. *227*, 1025 (1957).

which is more strongly adsorbed than any component of the sample. Thus, as the displacer substance moves through the column, it displaces the sample substances from the adsorbent, and these arrange themselves in an adsorption series ahead of the displacer. In order that the fronts of zones be as sharp as possible, a coupled segmented column is used in which the separation is sharpened by serial chromatography.

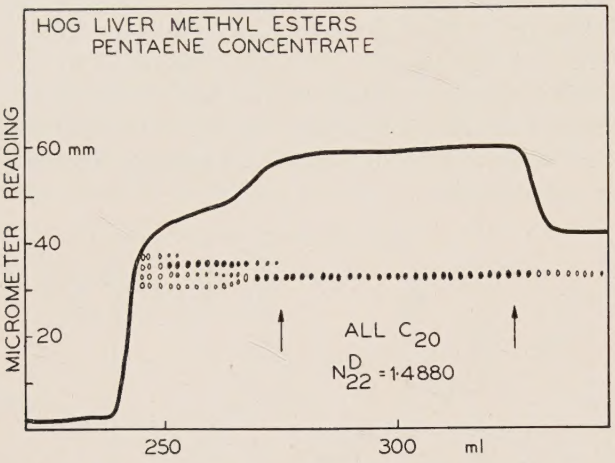


Fig. 5.—Isolation of methyl eicosapentaenoate by displacement chromatography on charcoal in 95% ethanol using 1% ethyl stearate as displacer. Paper chromatography was used to monitor fractions. HOLMAN and HAYES[11].

The isolation of methyl eicosapentaenoate, using displacement chromatography on charcoal with ethyl stearate as displacer, is shown in Figure 5. A concentrate of polyunsaturated esters was chromatographed, 5 ml fractions of eluate were collected, and an interferometric measurement of the refractive index of the effluent was made.

Paper chromatography was then used to assess the complexity of each fraction. It is seen that the first major zone indicated by the interferometer consisted of four unsaturated substances only partially segregated. The major substance was found by alkaline isomerization[12] to be a pentaene. The fractions between the arrows were combined, and a small portion was hydrogenated. Paper chromatography revealed only methyl eicosanoate to be present. Thus, the main fraction was identified as methyl eicosapentaenoate.

The isolation of ethyl octadecatetraenoate from cod liver oil esters by displacement chromatography is shown in Figure 6. The separation was performed and monitored in the same manner as described above. Representative fractions were also isomerized to identify the type of polyene unsaturation present. This revealed that the early fractions contained largely triene, and the latter fractions largely pentaene. The center cut was the ethyl octadecatetraenoate.

[11] R. T. HOLMAN and H. HAYES (unpublished data).

[12] R. T. HOLMAN, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 4 (Ed. by D. GLICK, Interscience, New York 1957), p. 99.

A similar experiment performed on glyceryl ethers shows the applicability of the method on lipides other than fatty acids and esters[13]. An ostensibly pure selachyl alcohol was found by paper chromatography to be contaminated with another unsaturated substance. The sample was also subjected to displacement chromatography, and the interferometric curve and paper chromatograms indicated the presence of three components. The first fraction (Fig. 7) was found to be a glyceryl ether of hexadecenol, and the final fraction is thought to be its C_{20} homolog. The main fraction was selachyl alcohol. Isomerization of representative fractions revealed that the glyceryl ethers were not polyenes.

Carrier displacement chromatography is a variation of the above technique in which a small amount of sample is chromatographed with an admixture of several unrelated substances to act as spacers. By this means the otherwise undetectable components of the sample are separated by a sufficient volume of effluent to make collection of fractions feasible. In Figure 8 such a separation is shown. 10 mg each of three branched isomers of stearic acid were added to 50–100 mg amounts each of methyl laurate, myristate and palmitate. This mixture was then chromatographed on carbon in ethanol using 1% methyl stearate as displacer. The individual branched isomers of stearic acid

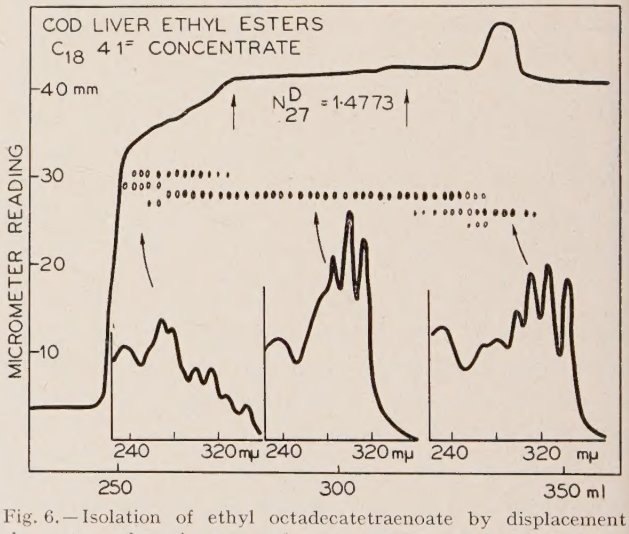


Fig. 6.—Isolation of ethyl octadecatetraenoate by displacement chromatography using paper chromatography to monitor fractions. Inserts are ultraviolet spectra of three representative fractions after alkaline isomerization. HOLMAN and HAYES[11].

were located by titration of 1 ml fractions. They were found to appear just ahead of each of the carrier substances, clearly separated. It is apparent that the type of branching of the chain strongly affects the adsorbability of these isomers of stearic acid.

Paper chromatography of fatty acids developed in recent years, is now used routinely as a test of purity

[13] H. K. MANGOLD, H. HAYES, and R. T. HOLMAN (unpublished data).

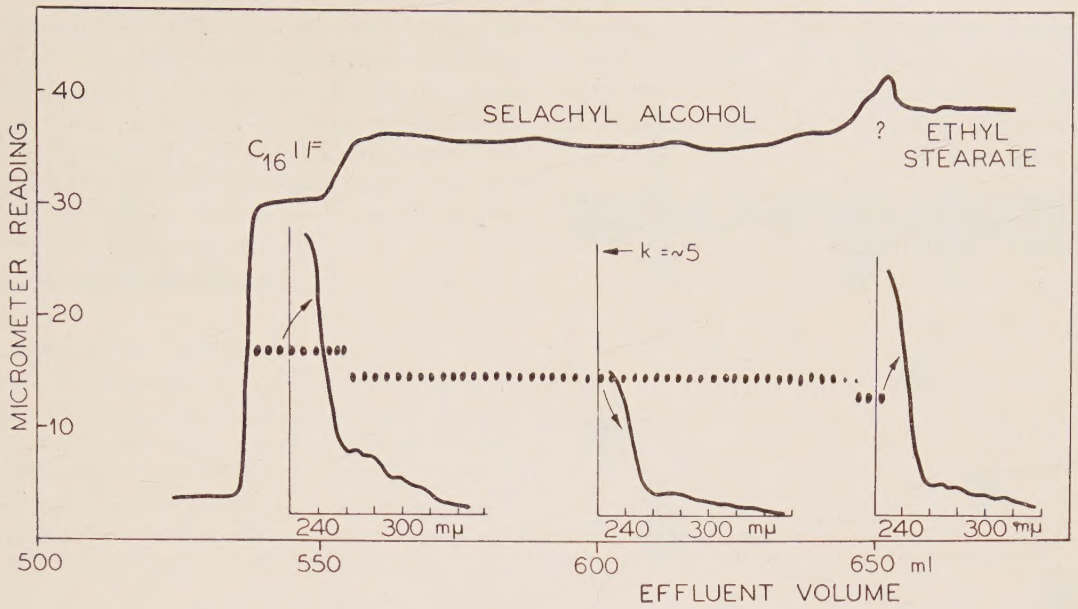


Fig. 7. — Separation of glyceryl ethers by displacement chromatography using paper chromatography to monitor fractions. Inserts are ultraviolet spectra of selected fractions after alkaline isomerization. Mangold, Hayes, and Holman[13].

and as a means of monitoring other separation procedures. Several techniques have been used in different laboratories, but comments here will be confined to the techniques developed in The Hormel Institute. In the techniques developed by Schlenk and his group[14,15] the fatty acids are spotted on siliconized paper and developed by a solvent chosen for the separation desired. For many fatty acid separations, 85% acetic acid is a good solvent. Spots on the developed chromatograms are made visible by spraying the paper with α-cyclodextrin and exposing to iodine vapor. This treatment develops light spots on a blue background, and both saturated and unsaturated acids and esters can be detected. If one is interested only in unsaturated substances, the use of α-cyclodextrin is not necessary, because unsaturated lipides yield yellow or brown spots when exposed to iodine vapor.

Figure 9 shows two paper chromatograms in which the unsaturated acids having 18 and 20 carbon atoms were separated. It will be seen also that a mixture containing acids of several chain lengths could not be clearly separated by this method. A prior separation according to chain length prevents the dilemma of inseparable pairs such as oleic and eicosadienoic acids. For establishing the purity or identity of unsaturated acids, paper chromatography of a hydrogenated sample is very helpful, because chain length can thereby be determined.

[14] H. K. Mangold, B. G. Lamp, and H. Schlenk, J. Amer. chem. Soc. *77*, 6070 (1955).

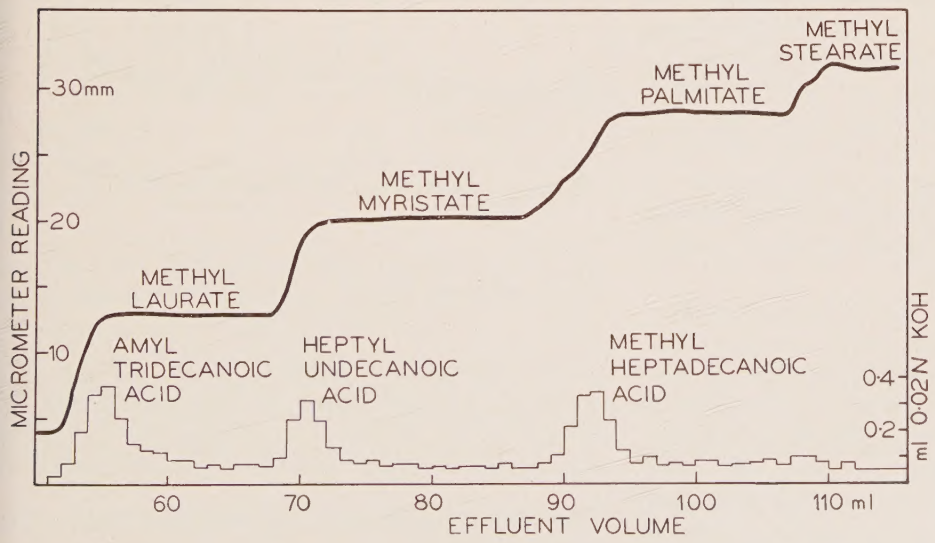


Fig. 8. — Carrier displacement separation of four branched isomers of stearic acid.

The problem of inseparable pairs has been partially solved in other ways by Schlenk and his coworkers[15]. Paper chromatography at low temperatures, e.g. separates the saturated acids as a group which does not migrate. Thus, palmitic and oleic acids which migrate together at room temperature are clearly separable at −5°. Myristic and palmitic acids remain

[15] H. Schlenk, J. L. Gellerman, J. A. Tillotson, and H. K. Mangold, J. Amer. Oil Chemists' Soc. *34*, 377 (1957). – H. K. Mangold, J. L. Gellerman, and H. Schlenk, Federation Proc. (in press).

at the origin, whereas the migration of oleic and linoleic acids is only somewhat reduced. Thus, it appears that by proper choice of conditions, otherwise inseparable pairs need not longer be a problem in paper chromatography.

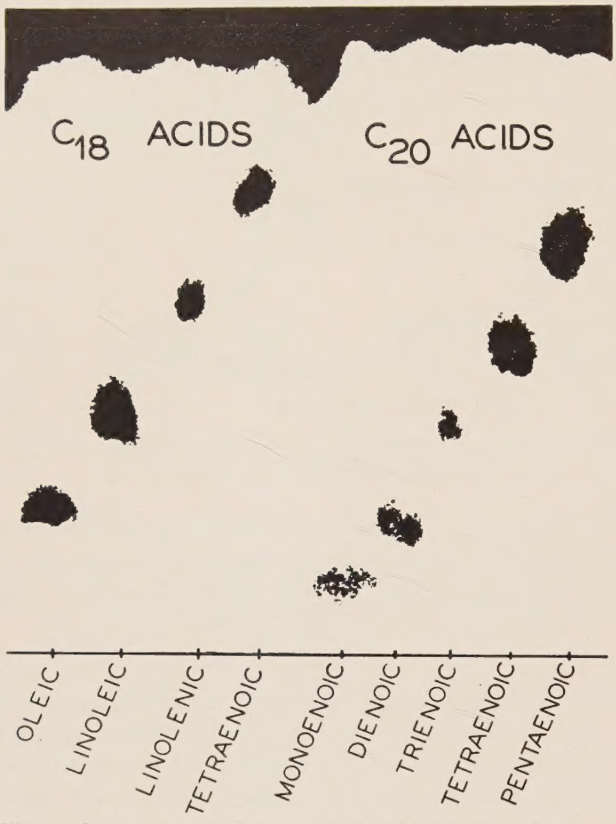


Fig. 9. — Separation of unsaturated fatty acids by paper chromatography. Holman[15].

A series of densitometer curves from radioautographs of paper chromatograms[15] is shown in Figure 10. After spotting the papers with methyl esters from radioactive *Chlorella* fatty acids, one paper was developed immediately and the others were stored dry for varying times prior to development. The developed chromatograms indicate that autoxidation is no problem under normal conditions, but that prolonged exposure of unsaturated substances on dry paper allows autoxidation. This experiment also illustrates the possible conversion of paper chromatograms to numerical data by means of densitometer curves. Analyses of fatty acids can by this method be made with an error of a few percent.

Gas phase chromatography is a technique for fatty acid analysis which is attracting much attention currently. To date, conditions have been found for very elegant separations of fatty acid esters up to 18 or 20 carbon atoms long. A column packed with inert material impregnated with a grease of very low vapor pressure is commonly used. An inert gas is passed through the heated column and the sample is injected into the stream of hot gas ahead of the column. The substances are retarded in the column more or less according to their vapor pressures and their affinities for the grease. The emerging vapors are detected by a katharometer, gas density balance, ionization chamber or other device. The gas phase chromatographic separation of the methyl esters of the fatty acids from human milk fat shown in Figure 11 is taken from the work of Insull *et al.*[16]. The chromatogram indicates that several previously unsuspected acids are present in the fat.

There is great current interest in separation of saturated and unsaturated esters from 18 to 22 carbon atoms in length, and conditions for better separation of these substances by gas phase chromatography are constantly being sought by many investigators, already with some encouraging results. These advances will require redesign of columns and detectors, and involve newer and more efficient packing materials, for the requirements of the problem appear to be just beyond the limits of current equipment.

The esters of mono- and dicarboxylic acids are easily separated and identified in the system of gas phase chromatography developed by James and Webb[17]. This work illustrates the potential of gas phase chromatography in determination of structure. By oxidative degradation of polyenoic acids, and chromatography of the esterified mono- and dicarboxylic acids derived from them, the positions of the double bonds in the unsaturated acids are readily deduced.

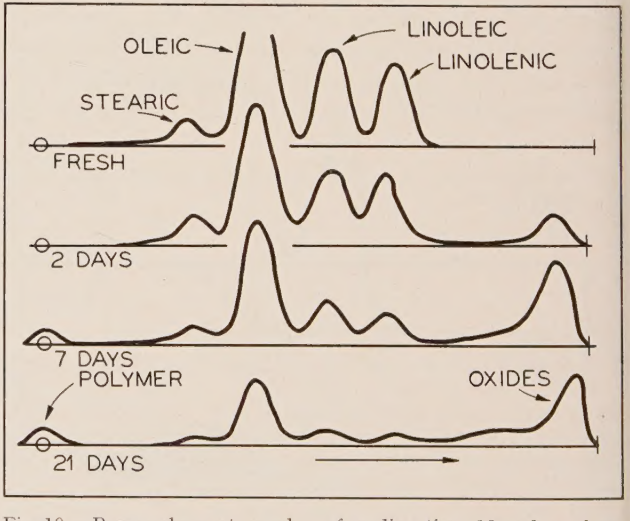


Fig. 10. — Paper chromatography of radioactive 18-carbon fatty acid methyl esters from Chlorella, showing the effect of autoxidation. From Schlenk *et al.*[14].

Mass spectrography should be mentioned here as a new physical method useful for identification and determination of structure. The method is currently being applied to substances with molecular weights as

[16] W. Insull, Jr., J. Hirsch, A. T. James, and E. H. Ahrens, Jr. (unpublished data).

[17] A. T. James and J. Webb, Biochem. J. *66*, 515 (1957).

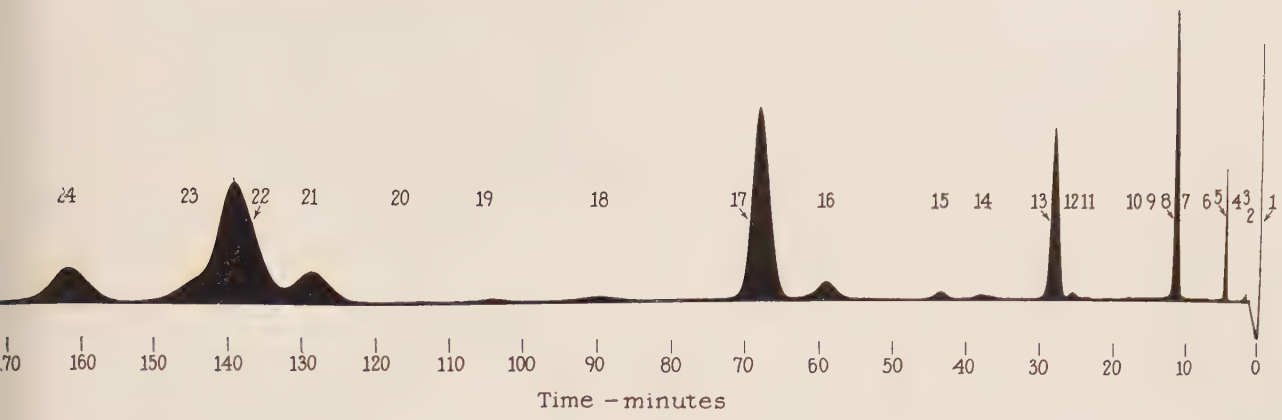


Fig. 11.—Separation of 0·86 mg of methyl esters of human milk fatty acids on a 4-foot column at 197°C with Apiezon M vacuum grease as stationary phase, N_2 pressure, 67 cm Hg and flow rate 54 ml/min. Peaks in order of appearance, right to left: (1) air, (2) two heptanoate esters, (3) two octanoate esters, (4) n-nonanoate, (5) n-decaoate, (6) probably n-undecanoate, (7) probably dodecenoate, (8) n-dodecanoate, (9) probably a branched tridecanoate, (10) n-tridecanoate, (11) probably a branched tetradecanoate, (12) tetradecenoate, (13) n-tetradecanoate, (14) probably two branched pentadecanoate, (15) n-pentadecanoate, (16) hexadecenoate, (17) n-hexadecanoate, (18) probably a branched and an unsaturated heptadecanoate, (19) n-heptadecanoate, (2) probably methyl ester of a branched C_{18} acid, (21) linoleate and linolenate, (22) oleate, (23) probably an isomer of oleate, (24) n-octadecanoate.
From Insull *et al.*[16].

high as 600. It therefore offers great promise in fatty acid chemistry. Stenhagen[18] has reviewed the mass spectrometry of long chain substances and he and his

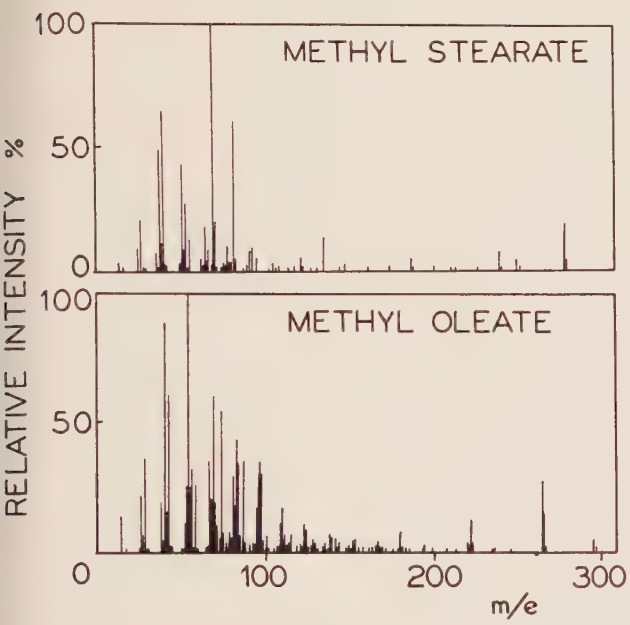


Fig. 12.—The mass spectra of methyl oleate and methyl stearate. Redrawn from Stenhagen[19].

group are currently studying the method for the determination of structure of branched fatty acids. When molecules are bombarded with electrons and the positively charged molecules and molecular fragments are accelerated by an electric field at right angles to a magnetic field, the ions travel through arcs, the radii of which depend upon the charge and mass of the ions. By proper adjustment of the magnetic field, the ionized particles can be admitted through a slit according to their mass, and thus their relative abundances are measured. Most of the molecules are fragmented by the bombardment by electrons, and the proportions of fragments of each mass is a characteristic of the parent substance. Unsaturation, branching and functional groups all affect the resulting mass spectra, because the fragments are different. The mass spectra of methyl stearate and methyl oleate, shown in Figure 12, illustrate the differences caused by one double bond in a fatty acid molecule.

From the methods of separation and analysis which have been discussed, it will be readily seen that our methodology is now dependent almost entirely upon physical separations. These methods have the inherent advantage that they leave the fatty acids unaltered or require so small a sample that recovery is not a factor. Another advantage of physical separations is that the conditions are subject to infinite variation. One can reasonably expect ultimately to find proper conditions for the separation of any and all fatty acids occurring in nature.

Acknowledgement.—I am indebted to Dr. O. S. Privett for the concentrate of methyl eicosapentaenoate used in one of the experiments reported here, and for reading this paper before the symposium when I became unable to attend.

Résumé

Le problème de la séparation des acides gras est exposé en détail. Les méthodes physiques couramment appliquées à une macro- ou micro-échelle sont discutées et l'on donne des exemples tirés de la littérature ou de méthodes récemment utilisées dans les recherches. Celles-ci comprennent la cristallisation, la distillation fractionnée, la distribution par contre-courant, la chromatographie en phase gazeuse et la spectrographie de masse.

[18] E. Stenhagen, Nordiske Kemikermøde i Aarhus, August 1956, p. 59.
[19] E. Stenhagen (unpublished data).

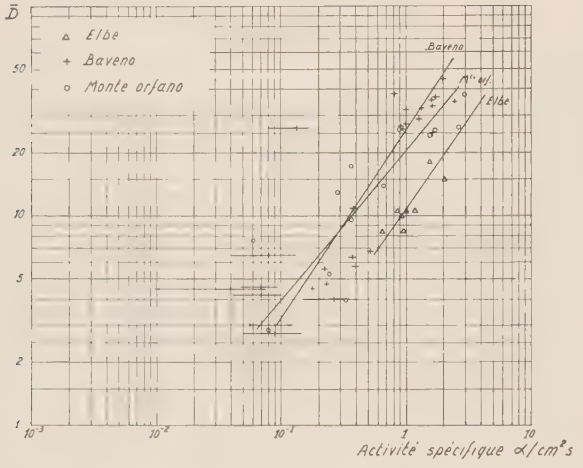
Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Age des halos pléochroïques des granites de Baveno et Monte Orfano

Les massifs granitiques du Lac Majeur, dont le plus typique est celui de Baveno, sont regardés par certains auteurs comme hercyniens[1] et par d'autres[2], comme tertiaires.

Nous avons étudié l'âge des halos pléochroïques dans les biotites des granites de Baveno et Monte Orfano, suivant la méthode précédemment décrite[3]. L'âge de ces deux granites a été comparé à celui de l'île d'Elbe dont l'âge miocène-oligocène correspond à 30 M.A.



Les biotites de Baveno, Monte Orfano et Elbe montrent des sensibilités très voisines pour l'effet de coloration due à l'irradiation expérimentale par les particules alpha. Les résultats des mesures de densité optique des halos et de l'activité alpha des inclusions correspondantes sont donnés à la Figure. On a tracé les meilleures droites passant par les points expérimentaux. Il n'y a pas de différence systématique dans la position des points relatifs à Baveno et Monte Orfano, ce qui revient à dire que ces deux granites ont des halos de même âge.

Quand on compare les halos de Baveno et Monte Orfano à ceux de l'Elbe, on voit que les halos de même densité sont causés par des activités spécifiques en moyenne 2,5 fois plus fortes dans le granite de l'Elbe que dans les deux autres granites. Compte tenu des erreurs sur la position des droites, l'âge de l'ensemble des halos de Baveno et Monte Orfano est compris entre 120 et 50 M.A.; l'âge le plus probable est 75 M.A. Ces résultats démontrent que les massifs de Baveno et Monte Orfano sont certainement antérieurs au tertiaire. L'âge des halos de 75 M.A. correspond à un âge crétacé qui pourrait être l'âge de l'intrusion.

On pourrait néanmoins supposer avec vraisemblance que ces granites sont plus vieux que le crétacé mais l'orogénèse alpine aurait effacé partiellement les halos[4]. Des déterminations d'âge par d'autres méthodes seront nécessaires pour élucider ce point.

S. Deutsch, E. Picciotto et E. Niggli

Laboratoire de Physique Nucléaire, Université de Bruxelles et Mineralogisch-petrographisches Institut Bern, le 6 janvier 1958.

Zusammenfassung

Das Alter der pleochroitischen Höfe in den Graniten von Baveno und Monte Orfano wurde durch Vergleich mit dem Elba-Granit zu ungefähr 75 Millionen Jahren (Kreide) bestimmt. Dies könnte dem Alter der Intrusion entsprechen; es ist aber auch möglich, dass diese älter, zum Beispiel herzynisch, ist (Schwächung der pleochroitischen Höfe während der alpinen Orogenese).

[1] V. Novarese, Boll. R. Uff. Geol. d'Italia *58*, nr. 11, 1 (1933). – P. Galitelli, Atti e mem. Reale Ac. Sci. Lett. Arte di Modena (5) 39 (1943).

[2] R. Staub, Beitr. Geol. Karte Schweiz, N.F. *52*, 23 (1924).

[3] S. Deutsch, P. Kipfer et E. Picciotto, Nuov. Cim. *6*, 796 (1957). – S. Deutsch, D. Hirschberg et E. Picciotto, Bull. Soc. belge Géol. *65*, 267 (1956). – S. Deutsch, Exper. *13*, 309 (1957).

[4] S. Deutsch et E. Picciotto, Exper. *14*, 128 (1958).

Etude des halos pléochroïques dans le granite de Medel (Massif du St-Gothard)

Nous avons déjà souligné l'intérêt d'étudier l'influence des phénomènes de métamorphisme sur la coloration des halos pléochroïques[1]. Nous présentons ici les résultats préliminaires obtenus sur le granite de Medel (= Medelser Granit, St-Gothard); ce granite hercynien s'est trouvé repris lors de l'orogénèse alpine dans la mésozone[2], zone correspondant à la recristallisation des biotites. L'âge de l'intrusion est considéré comme carbonifère, il est environ de 250 M.A.

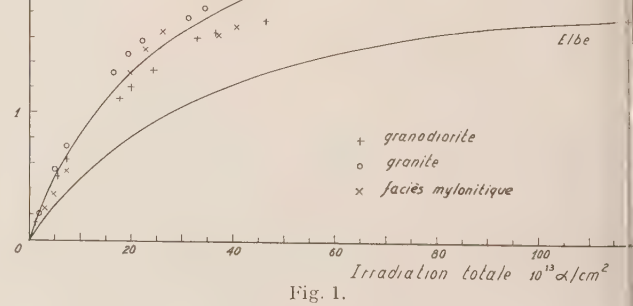


Fig. 1.

[1] E. Picciotto, Bull. Soc. Belge Géol. *59*, 102 (1950). – S. Deutsch, D. Hirschberg et E. Picciotto, Exper. *11*, 172.

[2] J. Cadisch et E. Niggli, *Geologie der Schweizer Alpen* (Wepf, Basel 1953).

Nous avons étudié les halos dans trois faciès du granite de Medel: les faciès normal, granodioritique et celui de bordure, mylonitisé. Les biotites ont des sensibilités comparables à l'irradiation expérimentale par des alpha[3]. Elles ont été comparées à celle du granite de l'Elbe (25–30 M.A. miocène-oligocène) que nous avons pris jusqu'à présent comme point de comparaison[4]. Les biotites du Medel montrent une sensibilité beaucoup plus grande que celle de l'Elbe (voir Figure 1), ce qui rend impossible une estimation directe des âges relatifs de ces deux granites.

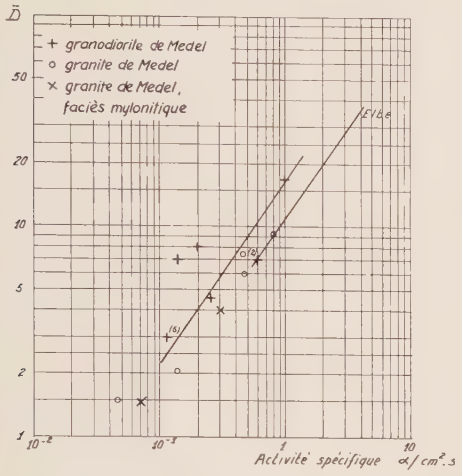


Fig. 2

On peut cependant tirer certaines conclusions des mesures des halos; les résultats sont reportés à la Figure 2, comme nous l'avons fait dans les articles précédents. L'isochrone de 30 M.A., correspondant à la biotite de l'Elbe, y est tracée. Les halos de Medel, en supposant une sensibilité égale pour ces biotites et celle d'Elbe, auraient un âge d'environ 60 M.A. Comme les biotites de Medel se colorent plus rapidement que celle de l'Elbe, cette valeur donne un âge maximum. On voit que l'âge maximum des halos (60 M.A.) est largement inférieur à celui de l'intrusion du granite (250 M.A.). Ces résultats mettent clairement en évidence l'action du métamorphisme alpin sur les halos du granite de Medel; ils démontrent les possibilités de cette méthode dans l'étude des effets du métamorphisme et la détermination de l'âge de ce métamorphisme. Des études plus poussées sont en cours sur ce granite et sur les roches métamorphiques environnantes.

Nous remercions les Professeurs C. Burri et E. Niggli de l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

S. Deutsch et E. Picciotto

Laboratoire de Physique Nucléaire, Université Libre de Bruxelles, le 6 janvier 1958.

Zusammenfassung

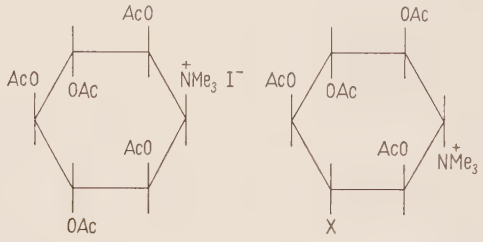
Es wird ein vorläufiger Maximalwert (60 Millionen Jahre) für das Alter der pleochroitischen Höfe des alpinmetamorphen Medelser-Granites (Gotthardmassiv) mitgeteilt. Das so bestimmte Alter dürfte demjenigen der alpinen Metamorphose entsprechen, welche die Biotite (mit ihren pleochroitischen Höfen) des wohl herzynischen Granites rekristallisieren liess.

[3] S. Deutsch, P. Kipfer et E. Picciotto, Nuov. Cim. *6*, 796 (1957).

[4] S. Deutsch, Exper. *13*, 309 (1957).

Labilization of Ester Bonds in Aminodeoxyinositol Derivatives as Mediated by Molecular Conformation

Recent work in these laboratories on the interaction between acetylcholinesterase and certain aminodeoxyinositol polyacetates has led to observation of marked differences in the uncatalyzed hydrolysis rates, depending on their molecular conformations. In particular, penta-O-acetyl-2-deoxy-2-trimethylammonium-*myo*-inositol iodide I has been shown to be relatively stable toward hydrolysis at neutral pH, as contrasted with penta-O-acetyltrimethylammoniumdeoxyscyllitol picrate (II; X ≃ OAc). The iodide I (m.p. 256–257°; found: C, 40·64; H, 5·29; N, 2·62; I, 22·76) at pH 7·3 and 25·14° exhibits a spontaneous k_1 for initial acetate hydrolysis of the order of $1{\cdot}2 \times 10^{-3}$ min^{-1}, while the less soluble *scyllo* derivative II (m.p. 193–194°; found: C, 45·21; H, 4·94) is intrinsically about ten times more rapid in its hydrolysis. That this is a general function of configurational difference was shown



II, X=OAc, picrate
III, X=NMe_2, dipicrate

by the further observations that: (i) in the case of D,L-tetra-O-acetyl-1,3-dideoxy-1-dimethylamino-3-trimethylammoniumscyllitol dipicrate (III; m.p. 212–214°; found: C, 42·13; H, 4·19; N, 13·09; CH_3CO, 19·5) with the same conformation as II the initial spontaneous hydrolysis rate at pH 7 is about 14 times that of I; (ii) an incompletely acylated sample of the chloride · HCl derivative of III hydrolyzes faster by a factor of 12; and (iii) the very sparingly soluble tetra-O-acetyl-1,3-dideoxy-1,3-bisdimethylaminoscyllitol (IV; m.p. 197–199° (sealed cap.); found: C, 53·71; H, 7·59; N, 6·91; CH_3CO, 42·5) has a higher hydrolysis rate than I at concentration levels at least tenfold lower. These comparisons are on the basis of *initial* hydrolysis rates, since in the representative instance of III a kinetic run over many half-lives on the initial rate basis indicated the complete hydrolysis of two acetyl groups and incomplete hydrolysis of a third. These initial rate differences are to be contrasted with the relatively small magnitudes and hence the essentially vanishing difference in hydrolytic activity (at pH 7·4) for *cis* and *trans* isomers in the 1,2-difunctional cyclohexane series[1].

Part of this labilization of ester groups in III and IV may reside in the presence of the second amino function, but the greater contributing factor undoubtedly results from the *overall* configurational difference (*cf.* the activity difference in I vs. II). In this connection it was of interest to compare molecular models of the *myo* configuration I (chair form, 5 equatorial substituents and 1 axial) with that of the *scyllo* species II (chair form, all equatorial), resulting in the observation that the solid angle of approach

[1] H. D. Baldridge, W. J. McCarville, and S. L. Friess, J. Amer. chem. Soc. *77*, 739 (1955).

of the nucleophilic agent water to the carbonyl carbon atom of either neighboring ester function in II can far exceed that in I, when the negative ends of the carbonyl dipoles are brought to their nearest approach distances (and presumably maximum interactions[2]) with the positive N atom.

A final noteworthy point lies in the experimental observation that acetylcholinesterase catalyzes[3] the acetate hydrolysis in I, but the maximum hydrolytic activity thus obtained is only equivalent to that already characteristic of II–IV in the absence of enzymatic catalysis.

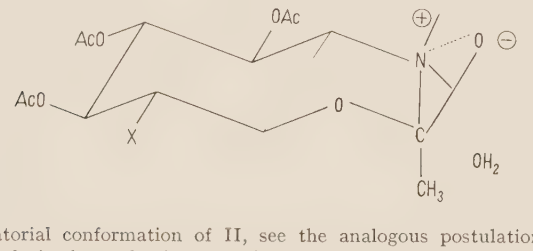
G. F. Holland*, B. Witkop* and S. L. Friess**

National Institute of Arthritis, and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Naval Medical Research Institute**, Bethesda (Md.), February 12, 1958.*

Zusammenfassung

Eine neue Art von Esterlabilisierung wurde in der Gruppe der Polyacetate tertiärer und (mono)quaternärer Inosamine und Streptamine entdeckt. Im Gegensatz zu den vergleichsweise beständigen Azetaten der quartären *cis*- und *trans*-Dimethylaminocyclohexanole zeigten Penta-O-acetyl-2-desoxy-2-trimethylammoniumscyllitol als auch D,L-Tetra-O-acetyl-1,3-bisdesoxy-1-dimethylamino-3-trimethylammoniumscyllitol rasche spontane Esterhydrolyse in wässrigem neutralen Medium, die grössenordnungsmässig vergleichbar war mit der unter Einwirkung von Cholinesterase beobachteten hydrolytischen Aktivität des – ohne Enzym beständigen – quartären Pentaacetats in der Myoinositol-Reihe. Offenbar spielt beim Zustandekommen solcher Labilisierungen die Totalkonformation der Molekel eine bisher nicht vermutete Rolle.

[2] For representative polar-type labilization of quaternary derivatives *via* some quasi-cyclic transition state (with greater planarity and stability in *scyllo* as compared with *myo*) such as that in the all



equatorial conformation of II, see the analogous postulation on hydrolysis of scopolamine methyl bromide [E. R. Garrett, J. Amer. chem. Soc. *79*, 1071 (1957); *77*, 4002 (1955)] and the analogies of H. B. Henbest *et. al.* [J. chem. Soc. *1957*, 1965)].

[3] Intrinsically the same shape for the activity vs. [S] profile was observed as that found previously for bifunctional cyclohexane derivatives; see ref. 1.

Phosphoribomutase- und 5-Phosphoriboisomerase-Aktivität in isolierten Zellkernen

In früheren Experimenten[1] wurde gezeigt, dass isolierte Zellkerne die Fähigkeit besitzen, anorganisches Phosphat in organische Verbindungen ohne besondere Energiezufuhr einzubauen. Als ein möglicher Weg wurde d Nukleosidphosphorylasereaktion[2] diskutiert. Diese Reak tion, bei der Ribose-1-phosphat entsteht, ist in Zellkerne nachgewiesen worden[3]. Wir haben nun den Stoffwechs des Ribose-1-phosphats weiterverfolgt und konnten da bei Phosphoribomutase- und 5-Phosphoriboisomerase Aktivität nachweisen. Phosphoribomutase katalysiert di Reaktion zwischen Ribose-1-phosphat (R1P) und Ribos 5-phosphat (R5P)[4], 5-Phosphoriboisomerase die Reaktio zwischen R5P und Ribulose-5-phosphat (Ru5P)[5].

Tabelle I

Phosphoribomutaseaktivität: Extrakte aus isolierten Zellkern oder Gesamthomogenat wurden gleichermassen mit Ammonium sulfatlösung fraktioniert. Die Aktivität des Enzyms wurde durc Messung der gebildeten, säurestabilen Phosphatester festgestell (*µM* säurestabiles Phosphat/mg Protein/20 min/37°C).

Fermentquelle	Mg^{++}-Endkonzentration	*µM* säurestabiles Phosphat
Leberhomogenat	10^{-3}	0,61
Leberzellkerne	0	0,46
	10^{-5}	0,56
	10^{-4}	0,68
	10^{-3}	0,70
Nierenhomogenat	10^{-3}	0,38
Nierenzellkerne	10^{-3}	0,46

Methodik.—Die Zellkerne wurden aus gut entblutete Lebern (erwachsene Ratten) oder Nieren (Schwein durch Fraktionierung in hypertonischer Rohrzucker lösung dargestellt[6]. Für die Messungen der Phosphoribo mutase wurde das aus Zellkernen bestehende Sediment im Porzellanmörser eingefroren, mit Seesand zerrieben und mit destilliertem Wasser (auf pH 8 eingestellt) extra hiert. 15–20% des Gesamt-N waren im klaren Extrak der anschliessend mit gesättigter Ammoniumsulfatlösun fraktioniert wurde[4]. Die Proteinfällung zwischen 60–80% Ammoniumsulfatsättigung wurde in destilliertem Wasse gelöst und nach Dialyse zum Enzymtest verwendet (8 bi 10 mg Protein/ml, gravimetrisch bestimmt).

Tabelle II

5-Phosphoriboisomerase: In den Versuchsansätzen konnten nach 20 min Inkubation bei 37°C folgende Mengen Ketozucker nachgewiesen werden (*µM* Ru5P/mg N/ 20 min/37°C).

Fermentquelle	Substrat	*µM* Ru5P
Leberhomogenat	R5P	13,1
Leberzellkerne	R5P	8,5–11,2
	R1P	2,2
	Ribose	0
Nierenhomogenat	R5P	11,0
Nierenzellkerne	R5P	5,1–14,4

[1] G. Siebert, K. Lang, S. Lucius und G. Rossmüller, Biochem. Z. *324*, 311 (1953).

[2] H. M. Kalckar, J. biol. Chem. *158*, 723 (1945).

[3] H. Stern, V. Allfrey, A. E. Mirsky und H. Saetren, J. gen. Physiol. *35*, 559 (1952). – K. Lang und K.-U. Hartmann (unveröffentlicht).

[4] A. J. Guarino und H. Z. Sable, J. biol. Chem. *215*, 515 (1955).

[5] B. L. Horecker, P. Z. Smyrniotis und I. E. Seegmiller, J. biol. Chem. *193*, 383 (1951).

[6] K. Lang und G. Siebert, Biochem. Z. *322*, 360 (1952).

Die Zellkerne, die für Phosphoriboisomerasemessungen dienten, wurden zur Beseitigung des Rohrzuckers zweimal in Ringerlösung gewaschen und anschliessend in Ringerlösung suspendiert (0,8–1,1 mg N/ml, kjeldahlometrisch bestimmt). R1P wurde durch Phosphorolyse von Guanosin gewonnen[4] und als Kaliumsalz verwendet (5 μM/ml).

Das Reaktionsgemisch für die Mutaseteste (5 ml 0,2 *M* TRIS-HCl-Puffer pH 7,4, 2 ml R1P-Lösung und 2 ml 0,005 *M* $MgCl_2$-Lösung) wurde 10 min auf 37°C vorgewärmt. Nach Zugabe von 1 ml Proteinlösung wurde in bestimmten Zeitabständen je 1 ml Probe entnommen, mit gleicher Menge eiskalter, 5%iger Perchlorsäure enteiweisst und der Gehalt an anorganischem und leicht säurehydrolysierbarem Phosphat bestimmt[7] (Hydrolyse 10 min bei 100°C in 1 *n* schwefelsaurer Lösung).

Die Phosphoriboisomeraseteste wurden nach Bruns[8] ausgeführt: Im Ansatz waren 1 Vol. 2%iger TRIS-HCl-Puffer pH 7,5, 1 Vol. 0,03 *M* Na-R5P-Lösung und 1 Vol. Zellkernsuspension. Während der Inkubation (mit 90 Schwingungen/min schüttelnd bei 37°C) wurden alle 5 min eine Probe (1,5 ml) entnommen, mit 8,5 ml eiskalter, 3%iger Trichloressigsäure enteiweisst und in 1 ml Überstand der Gehalt an Ketozucker mit Hilfe der Carbazolreaktion[9] bestimmt.

Ergebnisse. Phosphoribomutase: Während der Inkubation nahm der Gehalt an säurelabilem Phosphat linear zur Zeit und zur Enzymkonzentration ab. Die spezifischen Aktivitäten der aus Leber- und Nierenzellkernen dargestellten Proteinfraktionen waren einander ähnlich und lagen in derselben Grössenordnung wie eine ebenso hergestellte Proteinfraktion aus Gesamthomogenat (Tab. I). Im Gegensatz zu den Befunden von Guarino und Sable[4] wurde bei Zugabe von Mg-Ionen eine Steigerung der Enzymaktivität erreicht (Tab. I). Die Bildung von R5P konnte papierchromatographisch bestätigt werden.

5-Phosphoriboisomerase: Ketozuckerbildung war sowohl mit Leberzellkernen als auch mit Nierenzellkernen nachzuweisen. Die spezifischen Aktivitäten der beiden Enzymquellen zeigten keine charakteristischen Unterschiede (Tab. II). Das Reaktionsprodukt des Carbazoltestes ergab das für Ribulose charakteristische Absorptionsmaximum bei 540 mμ. Ribose als Substrat gab keine messbare Ribulosebildung; R1P wurde in geringem Masse zum Ketozucker isomerisiert infolge vorangehender Phosphoribomutasereaktion. Auf dem Papierchromatogramm wurde Ribulose-5-Phosphat gefunden.

K. Lang und K.-U. Hartmann

Physiologisch-chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 26. Januar 1958.

Summary

The existence of phosphoribomutase and 5-phosphoriboisomerase has been demonstrated in isolated cellular nuclei from rat liver and swine kidney. Phosphoribomutase has been shown to require Mg-ions for optimal activity.

[7] J. B. Martin und D. M. Doty, Anal. Chem. Wash. *21*, 965 (1951).
[8] F. H. Bruns, Biochem. Z. *327*, 523 (1956).
[9] Z. Dische und E. Borenfreund, J. biol. Chem. *192*, 583 (1951).

On the Location of Cholinesterase in Fishes

There seem to be few reports in the literature about the cholinesterase (ChE) activity in fish muscles[1]. However, Augustinsson[2] has reported an unusually high activity of acetylcholinesterase (AChE) in the guppy, *Lebistes reticulatus* and Nachmansohn[3] has found the same in the goldfish, *Carassius auratus*. The activities amount to 20 to 50 mg acetylcholine (ACh) hydrolyzed per 100 mg tissue/h (Prosser[4]). Similar results have been obtained by the present author (Lundin[5]). It is remarkable that the activity per unit weight is as high as about $^1/_{10}$th that of the electric organ in the electric eel (*Gymnotus electricus*), which is the richest source of ChE as yet known (e.g. Prosser[4]).

The present paper comprises a preliminary study on the basis for the high ChE activity in the muscles of guppy and goldfish and on the location of the activity.

The dependence of the ChE activity on the substrate-concentration and the inhibiting power of Mipafox [bis-(mono*iso*propylamido)-phosphoryl fluoride] and B & W 284C51 [bis-(p-N-dimethyl-allyl-ammoniumbenzyle)-aceton dibromide] have been recorded by means of an electrometric method (Tammelin[6]).

The tail muscles of a number of fishes, of which only guppy, goldfish and bream (*Abramis brama*) will be mentioned here, have been examined histochemically for ChE activity according to the method of Koelle[7] as modified by Holmstedt[8].

The biochemical investigations show that an esterase in the homogenized tail muscles of guppy and goldfish have the same properties as AChE (e.g. Augustinsson[9]). Thus the enzyme is completely inhibited by 10^{-5} M eserine and the substrate curves for ACh, propionylcholine and acetyl-β-methylcholine are bell shaped. Butyrylcholine is hydrolysed very slowly if at all. Thus it seems probable that no or only insignificantly small amounts of butyrylcholinesterase (BuChE) are present.

Furthermore, using the two specific inhibitors mentioned above, and after an incubation time of 30 min, it is observed that B & W 284C51, which inhibits AChE when acting on the enzyme in the fish muscle and on AChE from electric organ, gives inhibition curves that coincide fairly well between $pI_0 \simeq 7$ and $pI_{100} \simeq 5$. The same is true for Mipafox, the corresponding values being about 5 and 3. BuChE from serum is otherwise inhibited by Mipafox in far smaller concentrations, pI_{100} being about 6·5. (The values on electric organ and serum were kindly given by Dr. Bo Holmstedt.)

The results of the histochemical investigation are shown in Figures 1 to 4. Figure 1 shows the location of the AChE

[1] K.-B. Augustinsson, Acta Physiol. Scand. *15*, Suppl. 52, 65 (1948); Arch. Biochem. *23*, 111 (1949). – P. Laurent, C. R. Soc. biol. *146*, 1521 (1952). – G. Siou, C. R. Soc. biol. *149*, 1422 (1955). – C. L. Prosser, *Comparative Animal Physiology* (W. B. Saunders Company, 1950), p. 609. – D. Nachmansohn, C. W. Coates, and R. T. Cox, J. gen. Physiol. *25*, 75 (1941).
[2] K.-B. Augustinsson, Arch. Biochem. *23*, 111 (1949).
[3] D. Nachmansohn, C. W. Coates, and R. T. Cox, J. gen. Physiol. *25*, 75 (1941).
[4] C. L. Prosser, *Comparative Animal Physiology* (W. B. Saunders Company, 1950), p. 609.
[5] S. J. Lundin, Acta physiol. Scand. *42*, Suppl. 145, 102 (1957).
[6] L.-E. Tammelin, Scand. J. clin. lab. Invest. *5*, 267 (1953).
[7] G. B. Koelle, J. Pharmacol. exp. Therap. *103*, 153 (1951).
[8] B. Holmstedt, Acta physiol. Scand. *40*, 322, 338 (1957).
[9] K.-B. Augustinsson, *Methods of Biochemical Analysis*, vol. V (Ed. D. Glick, 1957), p. 2–3.

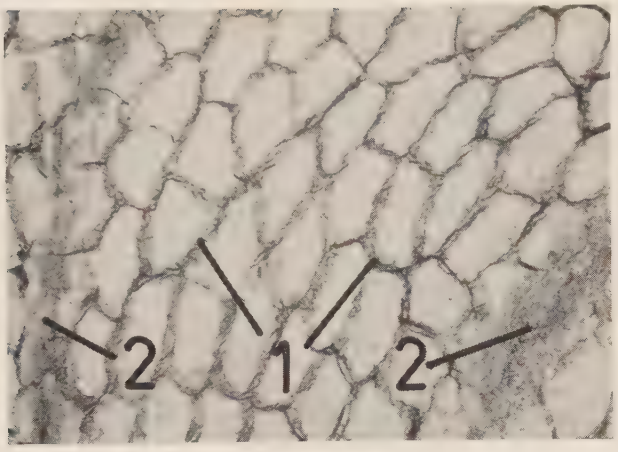


Fig. 1. – Transverse section from tail muscle of guppy. × 450. Enzyme activity demonstrated with acetylthiocholine according to Koelle and Holmstedt. 1. Endomysium. 2. Septae.

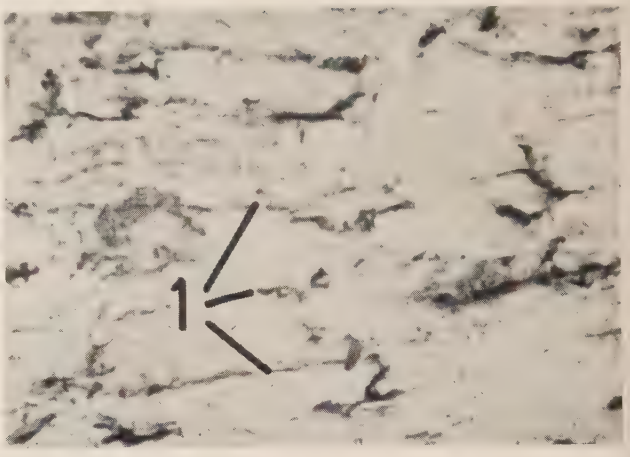


Fig. 3. – Longitudinal section from tail muscle of goldfish. × 450. See Figure 1.

Fig. 2. – Transverse section from tail muscle of goldfish. × 450. See Figure 1.

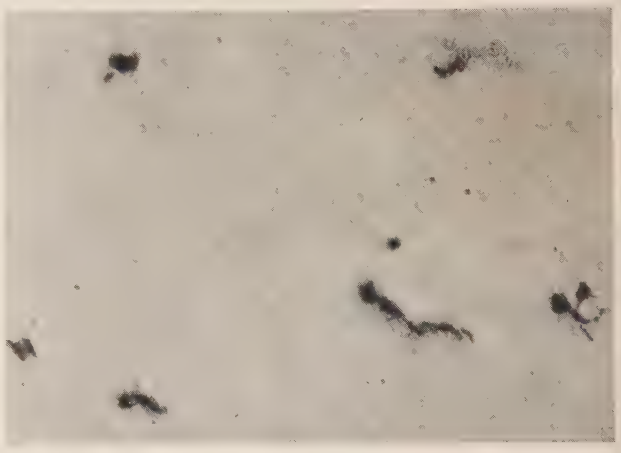


Fig. 4. – Longitudinal section from tail muscle of bream. × 450. See Figure 1.

activity in guppy as obtained on a transverse section from the tail muscle of guppy. The activity is localized to the endomysium around the muscle fibers. Some activity is obviously also found in the septae. A similar picture is obtained in a transverse section from goldfish muscle. (Fig. 2). A longitudinal section from goldfish is shown in Figure 3. The activity is clearly localized to the endomysium along the muscle fibers. These findings are interesting to compare with the results obtained by Siou[10], who, with a biochemical method, has found a considerable ChE activity in the aneural zone of the muscle of the common eel.

In sharp contrast hereto is the picture of a longitudinal section from bream as shown in Figure 4. The activity is here located in a way very reminiscent of that obtained at endplates in mammalian muscles. Apart from these heavily stained centers of CHE activity, the picture is completely blank.

From the above findings the following conclusions can be drawn. The muscles of goldfish and guppy have a high enzyme activity, which can be characterized as AChE activity. No or little activity from BuChE seems to be present.

In guppy and goldfish, a high proportion of the AChE activity is localized to the endomysium of the muscle fibers. The septae contain diffusely distributed AChE activity.

Studies concerning the possible role of this AChE activity for nerve transmission, and some phylogenetical and ecological problems, are under way, the results of which are to be published elsewhere.

Acknowledgements. My thanks are due to the chief of this Institute, Professor G. Ljunggren, who has kindly allowed me to work with this problem, and to Professor P. E. Lindahl, Institute of Zoophysiology, University of Uppsala, for his kind interest in my work.

S. J. Lundin

The Medical Division, Research Institute of National Defence, Dept. 1, Sundbyberg (Sweden), January 28, 1958.

Zusammenfassung

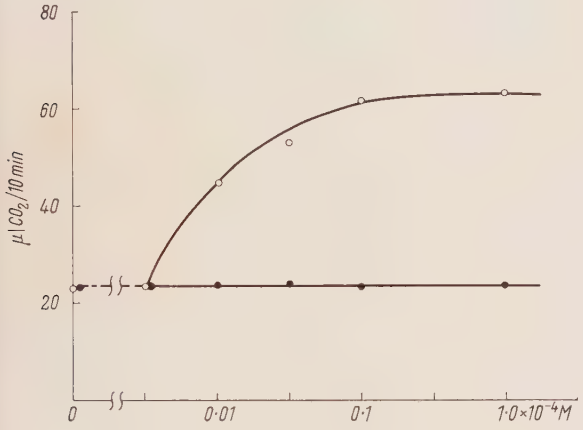
Es wird eine sehr hohe Acetylcholinesteraseaktivität im Schwanzmuskel von Guppy und Goldfish gefunden. Die Aktivität ist in Endomysium und Septa lokalisiert.

[10] G. Siou, C. R. Soc. biol. *149*, 1422 (1955).

The Interaction Between Pyridoxal-5-Phosphate and Arginine Apodecarboxylase

In previous papers[1], the interaction between pyridoxal-5-phosphate (Py-5-P) and potassium cyanide was described. The resulting addition product, namely a cyanohydrine, which has been characterized by us both spectrophotometrically and ionophoretically, appeared unable to activate the glutamic-oxalacetic apotransaminase prepared and almost completely resolved according to the procedure of O'Kane and Gunsalus[2]. On the other hand, no competitive action with Py-5-P was observed.

These results suggested that the 4-aldehyde group of Py-5-P is more likely involved in the interaction between Py-5-P and the specific protein portion (apotransaminase) rather than in the formation of a Schiff base between Py-5-P and the aminoacid substrate, as assumed by Schlenk and Fisher[3] in their well known scheme.



Activity curves of apodecarboxylase preparation after addition of Py-5-P (o—o) and of its cyanohydrine • •. The first curve is not influenced by previous or simultaneous addition of the cyanohydrine.

In order to verify whether such a rôle of the 4-aldehyde group of Py-5-P is essential in the activation process of apotransaminase only or of other apoenzymes (whose coenzyme is Py-5-P) as well, we have investigated the interaction between Py-5-P and arginine apodecarboxylase.

The enzyme preparation used in our experiments has been obtained from *Esch. coli*, Mac Leod ATCC 10536, according to Taylor and Gale[4]. The resolution obtained was about 65%. The decarboxylation reaction was followed in Warburg manometers containing 0·5 ml enzyme preparation, 1·5 ml M/5 acetate buffer pH 5·25 and 0·5 ml M/15 L(+)arginine. Experiments were carried out at 30°C and the evolution of CO_2 was studied for 10 min after addition of substrate (from the side bulb) following equilibration. The specific activity of the arginine apodecarboxylase preparation (in presence of $0{\cdot}5 \times 10^{-4}$ M Py-5-P) was 102, in terms of μl CO_2 liberated in 10 min/mg protein.

While KCN inhibits arginine apodecarboxylase activity as reported by Taylor and Gale[4], the cyanohydrine of Py-5-P does not modify the residual activity of the partially resolved enzyme. Thus, the enzyme preparation previously incubated for 30 min with Py-5-P cyanohydrine, even at a concentration 10^{-4} M, shows the same activity as the enzyme preparation not preincubated.

The activation curve of the arginine apodecarboxylase by Py-5-P is not influenced by the previous incubation of the enzyme with Py-5-P cyanohydrine, independently of the concentration of this latter. Further, the Py-5-P cyanohydrine does not interfere with Py-5-P in the activation process even when added to the apoenzyme simultaneously with Py-5-P (Figure).

As it appears from our results, the cyanohydrine of Py-5-P neither activates apodecarboxylase nor exerts a competitive action in regards to Py-5-P itself, so that the 4-aldehyde group of Py-5-P seems to be involved in the linkage to the apoenzyme.

It can be assumed that such a rôle is probably played by the 4-aldehyde-group in the case of any apoenzyme, whose coenzyme is Py-5-P.

V. Bonavita and V. Scardi

Institute of Human Physiology, University of Naples (Italy), December 18, 1957.*

Riassunto

Vengono descritti i risultati di indagini sull'interazione tra piridossal-5-fosfato ed apodecarbossilasi argininica.

La cianidrina del piridossal-5-fosfato non attiva l'apoenzima né riduce l'effetto attivante del coenzima naturale. Si presume che il gruppo aldeidico del piridossal-5-fosfato sia interessato nell'attacco all'apoenzima.

* Postal address: S. Andrea delle Dame, 8, Naples.

[1] V. Scardi and V. Bonavita, Boll. Soc. Biol. Sper. *33*, 770 (1957); Acta vitaminol. *11*, 117 (1957); Exper. *14*, 7 (1958).

[2] D. E. O'Kane and I. C. Gunsalus, J. biol. Chem. *170*, 425 (1947).

[3] F. Schlenk and A. Fisher, Arch. Biochem. Biophys. *12*, 69 (1947).

[4] E. S. Taylor and E. F. Gale, Biochem. J. *39*, 53 (1945)

Breakdown of Adenine Nucleotides in Beef Muscle *post mortem* and its Relation to the Content of Ammonia

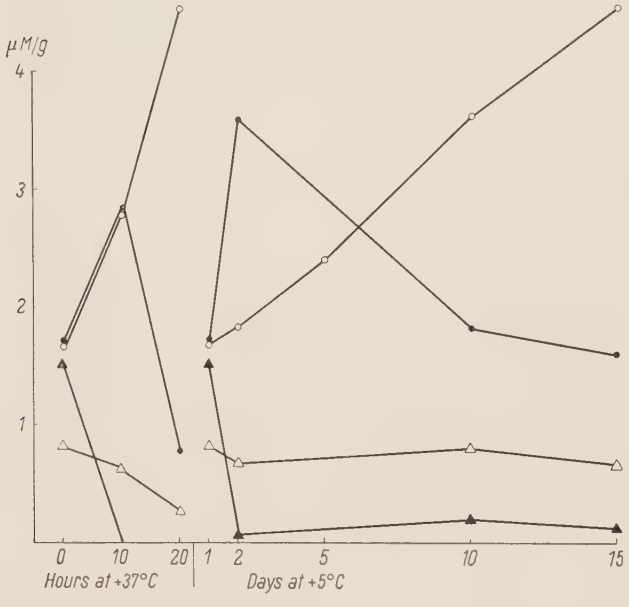
During the breakdown of adenosine nucleotides in muscle tissue *post mortem*, ammonia and inosinic acid (IMP) is released from adenylic acid (AMP). During autolysis of beef muscle at various temperatures, a different production of ammonia was found[1]. It was less during autolysis at + 37°C than at + 5°C, taking into consideration the increased temperature. To what degree the content of ammonia in muscle *post mortem* is released from them, is studied in this article.

Musculus psoas maior from 4 well nourished young bulls was used. One part of each was hung in a thermostate at + 37°C (100% relative humidity) and irradiated with ultraviolet rays. The greater part of each muscle was placed in a box at + 5°C (70% relative humidity)[2]. The first sample from the muscles was processed 3 h after slaughtering for the chromatography of free nucleotides. The other specimens were taken at different intervals of time. For chromatography, the tissue was extracted three times with 10% trichloracetic acid, which was then ex-

[1] Z. Dvořák (not publicated).

[2] Z. Dvořák, Čs. biologie *5*, 236 (1956).

tracted from the solution with ether[3]. The extract was adjusted to pH 8·5 and chromatographied through Dowex 2 (chloride form, 200–400 mesh, 1 × 12 cm) after washing with water and then by elution with 0·01 M NH_4Cl (the total volume of this fraction was about 1200 ml); then by elution with hydrochloric acid in the following concentrations: 0·001 M HCl; 0·003 M HCl; 0·005 M HCl; 0·01 M HCl; 0·02 M NaCl in 0·01 M HCl; 0·05 M NaCl in 0·01 M HCl; 0·2 M NaCl in 0·01 M HCl. 10 eluates 50 ml each were taken from every fraction manually and optical density at 250 mμ and 260 mμ was determinated by use of Beckman spectrophotometer.



The amount of ATP (▲), ADP (△), IMP (●) and hypoxanthine (○) in beef muscle during autolysis at two different temperatures.

In each pattern 10 greater peaks were detected, from which IMP, ADP and ATP were identified. AMP could not be reliably identified, although a little peak in the fraction eluted with 0·003 M HCl supported the possibility of its presence. The quantity was determinated using molecular extinction coefficients: 14200 at 260 mμ for phosphates of adenosine and 13200 at 250 mμ for IMP[4]. The fraction, which was eluted with 0·01 M NH_4Cl was all counted as hypoxanthine, using molecular extinction coefficient 8100 at 260 mμ[5].

Breakdown of nucleotides is distinct from the Figure, where mean values from 4 muscles are indicated. It is evident that, before the first analysis of specimens, the greater part of ATP was already dephosphorylated. That agrees with the high content of IMP and hypoxanthine. The amount of ADP during autolysis at + 5°C remained at the same level. It is probably nucleotide bound in myofibrils, which is not attacked by enzymes at lower temperature[6].

From the amount of hypoxanthine and IMP, the equivalent content of ammonia may be deduced. On the day of slaughter, the amount of both is equivalent to 6 mg% of ammonia in muscle. On the second and tenth day, it is equivalent to 9 and 10 mg% of ammonia respectively. From this fact, it is seen that ammonia is released from nucleotides only up to the second day. The desamination is probably in close connection with the destruction of ATP (the same agrees also for autolysis at + 37°C). As ATP is a criterium for beginning of *rigor mortis* in muscle[7], it may be said that the production of ammonia from nucleotides finishes at the beginning of *rigor mortis*.

The author wishes to express his thanks to Dr. Z. Brada from the Oncological Institute in Brno for the possibility of measuring with a Beckman spectrophotometer.

Z. Dvořák

Institute for Research of Meat and Fish, Brno (Czechoslovakia), December 4, 1957.

Zusammenfassung

Der postmortale Zerfall von Adenosintriphosphat im Rindermuskel wurde mit der Ammoniakbildung verglichen. Die Ammoniakbildung aus Nukleotiden ist mit dem Eintreten der Totenstarre beendet.

[3] R. Daoust and A. Cantero, Cancer Res. *15*, 734 (1955).
[4] A. Deutsch and R. Nilsson, Acta chim. scand. *7*, 1288 (1953).
[5] W. E. Cohn in: S. P. Colowick and N. O. Kaplan, *Methods in Enzymology*, vol. 3 (Academic Press, New York 1957), p. 740.
[6] S. V. Perry, Biochem. J. *51*, 495 (1952).
[7] T. Erdös, Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged *3*, 51 (1943).

Über Pflanzenwachstumsregulatoren*

Beiträge zur Kenntnis der phytotoxischen Wirkung von Triazinen

Die phytotoxische Wirkung von 2-Chlor-4,6-bis-(diäthylamino)-s-triazin wurde erstmals von Gast, Knüsli und Gysin[1] beschrieben. Später wurden weit wirksamere Verbindungen dieser Körperklasse aufgefunden, unter denen besonders Simazin [2-Chlor-4,6-bis-(äthylamino-)s-triazin] hervorsticht[2].

In dem durch Triazine hervorgerufenen Vergiftungsbild tritt normalerweise eine typische Chlorose auf. Es war deshalb naheliegend, die Frage zu prüfen, ob im Verlauf der Vergiftung Störungen in der CO_2-Assimilation, bzw. Stärkebildung auftreten. Für diese orientierenden Untersuchungen wurde *Coleus Blumei* Benth. als Versuchspflanze gewählt, ein Objekt, welches eine intensive Stärkeproduktion aufweist. Etwa 20 cm hohe Pflanzen wurden mit je 50 mg Simazin und Chlorazin behandelt. Als Vergleichsmittel wurde CMU in derselben Dosierung verwendet. Chlorazin wurde in Wasser emulgiert, Simazin und CMU in suspendierter Form appliziert. Pro Topf wurden 50 ml der Versuchslösungen, welche die oben angegebenen Mengen der Wirksubstanzen enthielten, verwendet. Die Flüssigkeitsmenge genügte, um die Topferde vollständig zu durchnässen. Die Pflanzen wurden vorerst während 6 Tagen im Gewächshaus gehalten, dann für zwei Tage ins Dunkle verbracht und hernach erneut belichtet. Nach sechs bzw. acht (nach der Dunkelperiode) und zehn Tagen (nach Beginn der zweiten Belichtung) wurden Blätter entnommen, mit heissem Alkohol vom Chlorophyll befreit und mit Jod-Jodkaliumlösung auf ihren Stärkegehalt geprüft. 6 Tage nach der Behandlung zeigten die mit CMU behandelten Pflanzen bereits als erste Ver-

* 3. Mitteilung (siehe auch die zwei folgenden Arbeiten Exer und Roth).
[1] A. Gast, E. Knüsli und H. Gysin, Exper. *11*, 107 (1955).
[2] A. Gast, E. Knüsli und H. Gysin, Exper. *12*, 146 (1956).

Behandlung	Stärkegehalt von Coleusblättern		
	6 Tage hell	2 Tage dunkel	2 Tage hell
Unbehandelt	Viel Stärke	Keine Stärke	Viel Stärke
CMU	Keine Stärke	Keine Stärke	Keine Stärke
Chlorazin (G 25804) . . .	Viel Stärke (wie Unbehandelt)	Keine Stärke	Wenig Stärke
Simazin (G 27692)	Sehr wenig Stärke (nur in den Randpartien)	Keine Stärke	Keine Stärke

giftungssymptome eintrocknende Blattränder; zu diesem Zeitpunkt erschienen die mit Chlorazin oder Simazin behandelten Pflanzen äusserlich noch vollständig normal.

Die Ergebnisse der Stärkeprobe gehen aus vorstehender Tabelle und den photographischen Aufnahmen (Abb. 1, 2) hervor.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass alle drei Substanzen die Akkumulation von Stärke verhindern, wobei Chlorazin aber deutlich schwächer als CMU oder Simazin wirkt.

In weiteren Versuchen wurde die Frage untersucht, wie bald nach der Behandlung der Versuchspflanzen die

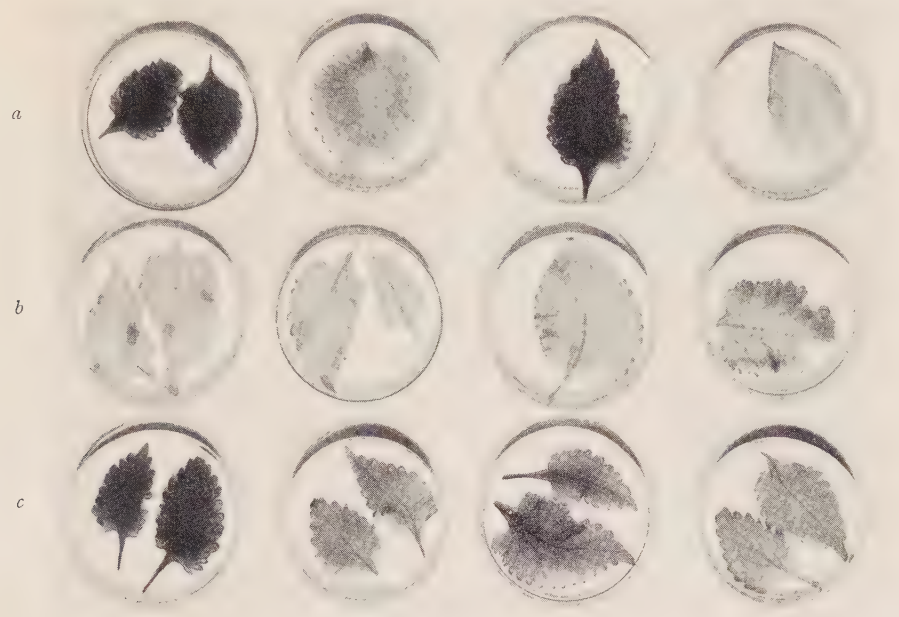


Abb. 1. Stärkegehalt von Coleusblättern nach Behandlung mit verschiedenen Herbiziden.
a Pflanzen nach Behandlung 6 Tage hell; *b* wie *a* + 2 Tage dunkel: *c* wie *a* + *b* + 2 Tage hell.

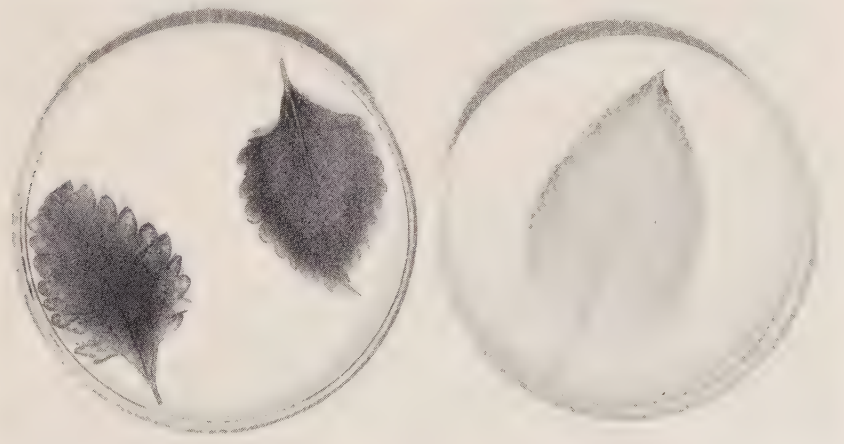


Abb. 2. Blätter von unbehandelter (links) und mit Simazin behandelter (rechts) Coleuspflanze, 6 Tage nach der Behandlung.

Stärkebildung ausbleibt. Coleuspflanzen, welche mit 30 mg Simazin AS pro Pflanze behandelt worden waren, zeigten *noch drei Tage später* eine normale Stärkebildung, am 4. Tag eine deutliche Abnahme und vom 6. Tag an keine Stärke mehr. Bei *Tropaeolum majus* erfolgt die Reaktion viel rascher. 15–20 cm hohe Pflanzen, welche ebenfalls mit 30 mg AS pro Topf behandelt worden waren, zeigten schon am ersten Tag nach der Behandlung keine Stärke mehr und 5 Tage später bereits starke Nekrosen.

Diese Versuche lassen die Frage offen, ob die verwendeten Herbizide bei der Zuckerbildung oder erst bei der Stärkeakkumulation eingreifen. Ein weiterer Versuch zeigte aber eindeutig, dass der Eingriff schon bei der Zuckerbildung erfolgt: werden nämlich stärkefreie Coleusblätter im Dunkeln auf einer Lösung von 0,125 mol Saccharose schwimmen gelassen, so wird auch in Gegenwart von Simazin Stärke gebildet.

Cocke[3] stellte für CMU fest, dass dieses Herbizid ebenfalls die Photosynthese stört, und zwar bereits bei der Hill-Reaktion eingreift. Untersuchungen von Exer mit Simazin (l.c.) und ähnlichen Triazinen[4] haben ergeben, dass auch diese die Hill-Reaktion hemmen. Somit gehen CMU und Simazin in ihrer phytotoxischen Wirkung, mindestens in bezug auf die CO_2-Assimilation, durchaus parallel.

In diesem Zusammenhang sei noch auf die Arbeiten von Jensch[5] und Friedheim[6] hingewiesen, welche zeigen, dass zwischen Harnstoffen und Triazinen auch auf anderen Gebieten auffallende Parallelitäten bestehen, zum Beispiel bezüglich ihrer Wirkung auf Bakterien und Protozoen (Trypanosomen).

A. Gast

Forschungslaboratorien der J. R. GEIGY AG., Basel, 2. Dezember 1957.

Summary

Experiments with *Coleus Blumei* and *Tropaeolum* showed that triazine compounds inhibit the photosynthesis, and, consequently, prevent the accumulation of starch. The chloroplasts of starchfree coleus leaves kept on a solution containing sugars and simazine are able to form starch again.

[3] A. R. Cooke, Weeds *4*, 397 (1956).
[4] B. Exer (noch unveröffentlichte Resultate).
[5] H. Jensch, Angew. Chemie *50*, 891 (1937).
[6] E. A. H. Friedheim, US 2 415 554.

Über Pflanzenwachstumsregulatoren

*Der Einfluss von Simazin auf den Pflanzenstoffwechsel**

Beim Kohlensäurestoffwechsel der Pflanze sind drei Reaktionsgruppen zu unterscheiden:

1. Die Photolyse des Wassers (Hillreaktion);
2. Die Atmung;
3. Die Assimilation der Kohlensäure.

Gewisse Strukturähnlichkeiten des Herbizids Simazin (2-Chlor-4, 6-bis-äthylamino-1, 3, 5-triazin, früher G 27692) mit Flavinadenin-dinukleotid veranlassten uns, Untersuchungen mit Flavinfermenten aufzunehmen. Es wurde besonders die Aktivität der DPNH-Oxydase untersucht, entweder direkt durch Verfolgung der Extinktionsabnahme bei 340 mμ[1] oder durch Messung der Reduktion von zugegebenem Cytochrom c oder Dichlorphenol-indophenol[2]. Diese Reaktionen konnten durch Simazin nicht beeinflusst werden.

Ein weiterer Beweis für das einwandfreie Funktionieren der Atmungskette ist der unveränderte Sauerstoffverbrauch von ungewaschenen Chloroplastensuspensionen (Spinat) in Anwesenheit von Hemmstoff (Warburgversuche).

In diesem Zusammenhang sind vielleicht noch die Versuche von Heim *et al.*[3] zu erwähnen. Das Herbizid AT (3-Amino-1, 2, 4-triazol) reduziert den Katalasegehalt der behandelten Pflanzen. Gesättigte Simazinlösungen lassen hingegen keine Hemmung der Chlorplastenkatalase erkennen.

Eine Hemmung der Hillreaktion durch Äthyl- und Phenylurethan ist schon 1940 von Hill und Scarisbrick[4] beobachtet worden. Ein bedeutend wirksameres Harnstoffderivat, das CMU (1, 1-Dimethyl-3-parachlorphenyl-Harnstoff) wurde 1956 von Cooke[5] beschrieben. CMU bewirkt eine Abnahme der Kohlehydrate in behandelten Versuchspflanzen (siehe auch Arbeit Gast[6]).

Aus diesen Gründen lag es nahe, die Versuche von Cooke zu wiederholen. Für das Studium der Hillreaktion verwendete dieser Autor den von Horwitz[7] vorgeschlagenen Redoxfarbstoff Janusgrün. Es zeigte sich in unseren Versuchen, dass technisches Janusgrün zuerst mit Äther extrahiert und dann an Aluminiumoxyd chromatographiert werden musste, um damit brauchbare Resultate zu erhalten. Gleichzeitig haben wir auch die ganze Methode näher untersucht.

Werden alle anderen Faktoren, wie Belichtungszeit, Chlorophyllkonzentration usw. konstant gehalten, so ist die Menge des gebildeten Diäthylsafranins von der eingesetzten Menge Janusgrün abhängig. Es wurde diejenige Janusgrünkonzentration ermittelt, bei welcher am meisten Diäthylsafranin erhalten wird. Wir konnten nachweisen, dass die Hillreaktion auch von Simazin gehemmt wird. Cooke konnte mit 10^{-7} m CMU die Hillreaktion fast vollständig unterdrücken. Wir benötigten dagegen für eine 50%ige Hemmung 8×10^{-7} m CMU oder 7×10^{-7} m Simazin. Diese Differenz beruht wahrscheinlich auf der Anwesenheit von Begleitstoffen des Janusgrün, welche die Wirkung von Simazin oder CMU verstärken. Wir haben im Ätherextrakt des technischen Farbstoffes solche Hemmstoffe nachweisen können. Eine analoge Potenzierung der Hemmung haben wir auch mit Strychnin beobachtet. Dieses Alkaloid ist ein Aktivator der Hillreaktion (Macdowall[8]). Im Vergleich zu den Kontrollen ohne Strychnin werden mit alkaloidhaltigen Ansätzen bei gleicher Simazinkonzentration die stärkeren Hemmungen erzielt. Um diese durch den unphysiologischen Redoxfarbstoff bedingten Effekt auszuschalten, wurden Versuche mit dem natürlichen Wasserstoffakzeptor DPN (Diphosphopyridinnukleotid) aufgenommen. San Pietro

* 4. Mitteilung (siehe vorstehende Arbeit von A. Gast und nachstehende Arbeit von W. Roth).

[1] K. H. Bässler und K. Lang, Arch. exp. Path. Pharmakol. *229*, 568 (1956).
[2] H. B. Burch, O. H. Lowry, A. M. Padella und A. M. Combs, J. biol. Chem. *223*, 29 (1956).
[3] W. G. Heim, D. Appleman und H. T. Pyfrom, Amer. J. Physiol. *186*, 19 (1956).
[4] R. Hill und R. Scarisbrick, Proc. Roy. Soc. London *B 129*, 238 (1940).
[5] A. R. Cooke, Weeds *4*, 397 (1956).
[6] A. Gast, Exper. *14*, 134 (1958).
[7] L. Horwitz, Plant Physiol. *30*, 10 (1955).
[8] F. D. H. Macdowall, Plant Physiol. *24*, 462 (1949).

und LANG[9] fanden, dass belichtete Chloroplasten unter anaeroben Bedingungen DPN zu DPNH reduzieren können. Wir konnten zeigen, dass auch dieser Prozess mit Simazin hemmbar ist. Die für eine 50%ige Hemmung benötigte Inhibitormenge musste im Vergleich zur Janusgrünmethode weiterhin erhöht werden, wobei jedoch für diese Versuche dichtere Chloroplastensuspensionen eingesetzt wurden. Diese Technik ermöglichte es uns, den Angriffspunkt des Simazins innerhalb der Hillreaktion etwas genauer zu lokalisieren. Bei konstanter Inhibitor- und DPN-Konzentration verhält sich die Hemmung der Hillreaktion umgekehrt proportional zur verwendeten Chlorophyllmenge. Umgekehrt lässt sich die Hemmung bei konstanter Hemmstoff- und Chlorophyllkonzentration nicht durch die Variation der DPN-Konzentration beeinflussen. Simazin und DPN treten somit nicht miteinander in Konkurrenz.

Die Maispflanze ist gegenüber Simazin weitgehend resistent[10]. Nach ROTH[11] beruht diese Tatsache auf der Fähigkeit des Maises, Simazin enzymatisch abzubauen. Isolierte Maischloroplasten erweisen sich im Hilltest nach unseren Versuchen als gleich empfindlich wie Spinatchloroplasten.

Eine ausführliche Beschreibung der Methoden wird an anderer Stelle erscheinen.

B. EXER

Forschungslaboratorien der J. R. GEIGY AG., Basel, den 2. Dezember 1957.

Summary

Simazin inhibits the Hill reaction, i.e. the use of light energy for the synthesis of energy-rich compounds. Isolated maize (corn) and spinach chloroplasts are, when analyzed in the Hill reaction, equally sensitive to the inhibitory action of Simazin. Furthermore, it does not influence the activity of catalase, nor does it inhibit respiration.

Competitive inhibition of DPN is not seen in the presence of Simazin. On the other hand, this compound appears to interfere directly with the intermediate steps needing chlorophyll.

[9] A. SAN PIETRO und H. M. LANG, Science *124*, 118 (1956).
[10] A. GAST, E. KNÜSLI und H. GYSIN, Exper. *12*, 146 (1956).
[11] W. ROTH, C. R. Acad. Sci. (Paris) *245*, 942 (1957).

Substances régulatrices de la croissance végétale*

Etude de l'action de la Simazine sur la physiologie d'Elodea

Afin de préciser l'action phytotoxique de la Simazine – substance herbicide[1] –, une série d'expériences a été entreprise avec Elodea. Cette plante complètement submergée se prête particulièrement bien à l'étude des échanges gazeux et de l'action des substances en solution.

Méthode expérimentale. Les échanges gazeux sont analysés d'après la méthode indiquée par PAECH et SIMONIS[2].

Des récipients de verre blanc d'un contenu de 100 cm³ sont utilisés comme suit:

récipient 1: eau;
récipient 2: deux rameaux d'Elodea immergés dans l'eau;
récipient 3: deux rameaux d'Elodea immergés dans une solution aqueuse de Simazine (2000 µg/l).

Une série d'essais comporte deux jeux des récipients 1 à 3; un jeu est exposé à la lumière du jour, l'autre est mis à l'obscurité. Après un temps donné, l'oxygène contenu respectivement dans l'eau et dans la solution de Simazine est dosé par la méthode iodométrique de WINKLER[3]. Le poids sec des plantes est déterminé à 110°C.

Le bilan de O_2 est exprimé en milligrammes de O_2 produit (+) ou utilisé (–) pendant 1 h/g de poids sec d'Elodea; il se calcule par différence 1° entre la teneur en oxygène dans l'eau (récipient 1) et celle de l'eau avec Elodea (récipient 2), 2° entre la teneur en O_2 du récipient 1 et celle de la solution de Simazine avec Elodea (récipient 3).

Influence de la Simazine sur l'assimilation chlorophyllienne et la respiration

Les échanges chlorophylliens et respiratoires sont étudiés d'une part dans l'eau, d'autre part dans la solution aqueuse de Simazine.

Dans le Tableau ci-dessous sont groupées les valeurs déduites d'une série de mesures, prise parmi une dizaine qui ont été effectuées et qui donnent des résultats conformes.

Tableau I

Exposition	Milieu	Bilan de O_2 (mg)*
lumière . . .	eau	+ 2,21
	solution de Simazine	— 0,22
obscurité . .	eau	— 0,81
	solution de Simazine	— 1,32

* mg de O_2/g de poids sec d'Elodea/h.

On constate les faits suivants:

1° dans la solution de Simazine le bilan de O_2 est négatif à la lumière; ce qui montre que l'assimilation chlorophyllienne est inhibée.
2° à l'obscurité, l'utilisation d'oxygène est plus importante dans la solution de Simazine; pour le rameau immergé dans cette solution, l'activité respiratoire serait donc plus intense.

Réversibilité de l'action physiologique de la Simazine

Des rameaux d'Elodea sont immergés dans la solution de Simazine (2000 µg/l); après 48, 96 et 336 h respectivement, ils sont lavés à l'eau courante et immergés à nouveau dans l'eau pour l'évaluation du bilan de O_2. Les résultats sont groupés dans le Tableau II.

Ces résultats montrent que l'effet de la Simazine est réversible. En ce qui concerne l'assimilation chlorophyllienne, la restauration est totale après 96 h, mais pour une durée prolongée, 336 h par exemple, la restauration n'est plus que partielle.

* 5e communication (voir les travaux précédents de A. GAST et B. EXER).
[1] A. GAST, E. KNÜSLI et H. GYSIN, Exper. *12*, 146 (1956). – C. BARTLEY, Agric. Chem. *12*, 34 (1957).
[2] K. PAECH et W. SIMONIS, *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen* (Berlin 1952).
[3] L. W. WINKLER, Z. anal. Chem. *53*, 665 (1914).

Tableau II

Durée de contact avec la Simazine (h)	Exposition	% par rapport au témoin	
		production O_2	utilisation O_2
48	lumière	100% et plus	—
96	lumière	100% et plus	—
336	lumière	10%	—
336	obscurité	—	100% et plus

Comportement des cellules en présence de la Simazine

Etude descriptive. Lorsque les rameaux d'Elodea exposés à la lumière sont transportés dans la solution de Simazine, on constate l'arrêt immédiat du dégagement des bulles d'oxygène. A ce moment-là, l'observation cytologique ne révèle aucun changement des constituants cellulaires: les plastes ont un aspect normal, le mouvement de cyclose se poursuit régulièrement. Après 96 h aucun changement ne peut être décelé au niveau des cellules par la simple observation. Après 336 h, le bourgeon terminal étant en grande partie altéré, l'observation cytologique dans les tissus apparemment sains révèle que la cyclose ne se produit plus dans toutes les cellules; elle est intermittente ou ralentie, mais les chloroplastes sont encore normaux d'aspect.

D'autre part, l'observation des chloroplastes en lumière ultraviolette, après 336 h d'immersion dans la solution de Simazine, montre que la fluorescence persiste.

Etude histochimique. Des rameaux d'Elodea sont immergés d'une part dans une solution aqueuse de chlorure de triphéniltétrazolium (TTC) à 0,1%, d'autre part dans une solution de TTC (0,1%) et de Simazine (2000 μg/l). Le TTC est réduit dans les cellules d'Elodea en présence de Simazine: le dérivé hydrogéné «Formazane», teinté de rouge, s'observe parfaitement, d'abord à la périphérie de la cellule, puis au niveau des chloroplastes. Il est important que cette hydrogénation, connue comme phénomène diastasique et due à l'action de déshydrases, puisse s'observer en présence de la Simazine. Ce fait, de même que la restauration précédemment décrite, tendent à montrer que la Simazine n'agit pas par blocage des systèmes déshydrasiques en action dans la cellule.

W. Roth

Institut de Botanique, Strasbourg, le 2 décembre 1957.

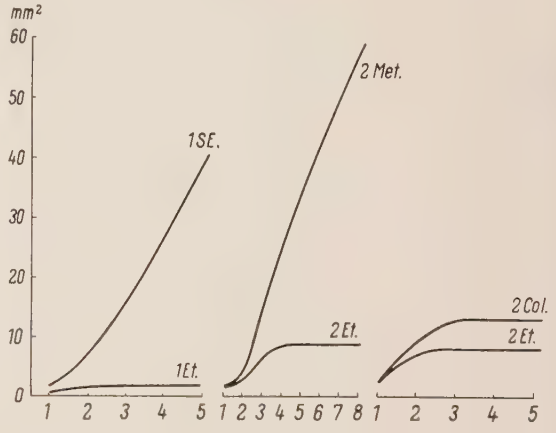
Zusammenfassung

Durch Einwirkung von Simazin wird bei Elodea die Photosynthese gehemmt, der Sauerstoffverbrauch durch Atmung erhöht und keine Zerstörung der Zellbestandteile beobachtet. In Gegenwart von Simazin bleiben die Deshydrasesysteme der Zelle aktiv.

Metionina, etionina, colina nel metabolismo intermedio dei fibroblasti coltivati *in vitro*

L'azione antagonista e dismetabolica esplicata dall'etionina nei confronti della metionina, sia nella sintesi proteica che nel normale trasferimento dei metili labili, rende probabile un intervento diretto dell'antimetabolita sui processi dell'anabolismo cellulare. In queste ricerche noi abbiamo esaminato l'azione a livello cellulare dell'etionina, metionina e colina studiandone l'attività sull'accrescimento dei fibroblasti in coltura *in vitro*, e cioè al di fuori di ogni possibile regolazione ormonica ed umorale.

Ci siamo serviti a tale scopo della tecnica di coltura in piastra secondo Carrel, aggiungendo l'etionina all'estratto embrionale utilizzato per l'allestimento sia della fase solida che di quella fluida di coltura, ad una concentrazione finale del 0,6 p. 100, e servendoci come espianto di stipiti di fibroblasti dal tendine e dal cuore dell'embrione di pollo di sette giorni di incubazione, previamente intrattenuti in goccia pendente per 5–6 passaggi. All'atto dell'allestimenti delle piastre ciascun espianto veniva diviso in due parti per quanto possibili uguali, l'una delle quali veniva sottoposta all'azione dell'etionina e l'altra mantenuta come controllo. L'accrescimento è stato valutato misurando planimetricamente l'area coperta nei giorni successivi dalle colture e dai controlli.



Azione dell'etionina, metionina e colina sull'accrescimento *in vitro* dei fibroblasti dal cuore di pollo. Curve di accrescimento assoluto in presenza di solo estratto embrionale diluito al terzo (*SE*), di estratto addizionato rispettivamente del 0,6% di sola etionina (*Et*), e di quantità equimolecolari di metionina, ma senza etionina (*Met*), di etionina + colina aggiunte contemporaneamente alla medesima coltura (*Col.*). In ordinate: aree ricoperte dalle colture in mm²; in ascisse: giorni di coltura. Spiegazioni nel testo.

In tutti i casi l'aggiunta di etionina alla fase liquida di coltura nella concentrazione suddetta porta ad un rapido blocco dell'accrescimento cellulare: dal secondo, terzo giorno non si osserva più incremento di area in tutte le colture trattate. Gli elementi coltivati mostrano segni di sofferenza cellulare grave, con aree di migrazione molto rade, cellule stellate con prolungamenti ramificati, ampia infiltrazione lipidica dei pochi elementi migrati nel coagulo. L'accrescimento dei controlli in solo estratto ed in estratto addizionato di metionina è invece regolare ed uniforme, con ampie aree di migrazione, costituite da cellule stipate di forma fusata. Nei controlli in metionina si osserva una infiltrazione lipidica notevole degli elementi migrati. Gli espianti sottoposti contemporaneamente all'azione dell'etionina e della colina mostrano un iniziale recupero della capacità di accrescimento, che per altro è quantitativamente limitato e di breve durata.

L'etionina esplica dunque un'azione diretta sui processi dell'anabolismo cellulare, che negli elementi coltivati *in vitro* si estrinseca in un rapido blocco della migrazione e riproduzione cellulare. Tale blocco è riferibile all'attività dismetabolica dell'antagonista, e non alla concentrazione aminoacidica elevata del mezzo, dato che i tessuti espiantati tolleramo bene quantità equimolecolari di metionina. L'incapacità della colina ad invertire l'inibizione pone il problema se il blocco sia da attribuire piuttosto ad un'inibizione dei meccanismi

della sintesi proteica, che ad una alterazione nel trasferimento dei metili labili.

La metionina appare perciò, almeno indirettamente, un fattore indispensabile di accrescimento dei tessuti coltivati *in vitro*, che necessitano di un regolare rifornimento e disponibilità dell'aminoacido libero, onde provvedere al ricambio e alla sintesi di nuovo protoplasma.

A. Cestari, C. Rizzoli e M. A. Gliozzi

Istituto di Farmacologia e Terapia sperimentale e Istituto di Istologia e Fisiologia generale dell'Università di Bologna, 26 novembre 1957.

Summary

The administration of ethionin to tissue cultures of fibroblasts *in vitro* causes a rapid and total inhibition of the growth of the transplanted tissues.

It was observed that equimolar quantities of methionin are, on the contrary, well tolerated. The inhibition is therefore seen to be due to the dismetabolic activity of the antagonist.

The contemporary administration of cholin is not able to restore the growth capacity of ethionin inhibited tissue cultures.

In conclusion, ethionin produces a direct action on fibroblasts *in vitro*, probably intervening in the process of protein synthesis of the transplanted elements.

An Attempt to Transfer Tumor Protein Specificity to a Foreign Protein

In the present work, an attempt was made to obtain chicken antibodies possessing some combining groups characteristic of proteins of the Jensen sarcoma of the rat. The procedure was to obtain a rabbit antiserum to the Jensen sarcoma and then a chicken antiserum in response to injections of this rabbit antiserum. If the chicken antibodies contained combining groups similar to tumor proteins, then injection of these antibodies into rats might possibily offer a means for the host to produce its own antibodies against these tumor specific determinate groups. These modified chicken serum proteins would be expected to be antigenic in the rat whereas the tumor proteins themselves are apparently not antigenic. Such a system might allow a specific means of inhibiting tumor growth.

Materials and Methods.—Bits of the Jensen sarcoma were excised from rats, washed thoroughly in saline, homogenized, and a 5% suspension of this preparation was serially injected intravenously into rabbits on alternate days, in 0·5 ml, 1·0 ml, and 1·5 ml doses. Following a one week rest period, the rabbits were given a further injection of 1·0 ml of the antigen and 48 h later the serum was collected. This antiserum reacted with the antigen at an antiserum dilution of 1:1000. After absorption with normal rat serum, this antiserum still had a titer of 1:128 with the supernate of the Jensen sarcoma, but gave no reaction with normal rat liver, kidney or muscle supernates. The γ globulin fraction of the antiserum was collected by ammonium sulfate precipitation. After dialysis against physiological saline to remove ammonium sulfate, three intravenous injections of 2·0 ml each of the rabbit γ globulin fraction were administered to chickens on alternate days. The chicken serum which was collected 10 days after the last injection had an antiserum dilution titer of 1:512 when reacted against the rabbit γ globulin fraction. The diffusion gel technique described by Ouchterlony[1] was used to test for any similarity between the tumor antigen preparation and the chicken antiserum.

Results.—The soluble supernate of the tumor showed only one precipitate line for the reaction with the rabbit γ globulin fraction, while the chicken antiserum showed two precipitate lines for the reaction whith the rabbit γ globulin fraction. However, the precipitate lines from these two sets of reactions crossed and did not show the reaction of identity (Björklund[2]), thus indicating that the tumor antigen and the chicken antibodies did not share any similar combining groups.

Apparently the antibodies formed by the chicken in response to rabbit antibodies against the Jensen sarcoma are primarily directed against the rabbit serum protein, rather than to any of its combining groups which have a complimentary configuration to determinate groups of the proteins of the Jensen sarcoma. These results are somewhat similar to those of Smith and Marrack[3] with another serological system.

This work was supported by Cancer Research Funds of the University of California.

D. E. Rounds and R. A. Flickinger

Department of Zoology, University of California, Los Angeles, January 1, 1958.

Résumé

L'essai de transférer la spécificité des protéines d'une tumeur à une protéine étrangère par un procédé sérologique, a donné un résultat négatif.

[1] Ö. Ouchterlony, Lancet *256*, 364 (1949).
[2] B. Björklund, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *79*, 319 (1952).
[3] F. C. Smith and J. Marrack, Brit. J. exp. Path. *11*, 494 (1930).

Comportement nucléaire anormal dans la racine d'*Ornithogalum umbellatum* L.

Une étude générale portant sur les aspects cytologiques observables par suite d'altérations du matériel chromatique nous a conduit à prospecter, parmi les Liliacées, le genre *Ornithogalum*. Il est largement représenté en Alsace où cinq espèces ont été décrites. *Ornithogalum caudatum* Ait. cultivé en serre a également fait l'objet de notre étude et nous a montré des phénomènes d'agglutination au niveau des anthères, dans les cellules-mères. Sur *Ornithogalum umbellatum*, en station naturelle, nous avons vu l'agglutination dans les cellules-mères de pollen, et la recherche du nombre chromosomique a donné respectivement 43 et 46 unités, dans des plantes de même provenance (l'existence de nombres divers dans cette espèce est d'ailleurs connue)[1]. (Fig. 1.)

Après étalement de pointes de racines et coloration au carmin ferrique, nous avons observé un comportement

[1] J. de B. Neves, cité par C. D. Darlington et A. P. Wylie, *Chromosome Atlas of Flowering Plants* (Allen and Unwin Ltd., London 1955), p. 351.

nucléaire anormal: dans un nombre élevé de cellules apparemment saines, des noyaux à l'état quiescent subissent un partage en deux parties souvent inégales à la suite d'un étirement énergique de part et d'autre d'un plan défini (Fig. 2). Bien qu'il n'y ait pas d'individualisation de chromosomes et que le matériel nucléaire garde

Fig. 1. Etalement, métaphase 2 n = 43.

son aspect quiescent, à l'observation, ce partage présente l'aspect d'une séparation anaphasique. L'anomalie semble toucher aussi bien les noyaux d'aspect normal que ceux qui présentent des degrés divers de condensation, mais l'écartement des parties séparées est d'autant plus grand que le matériel nucléaire est plus dense. Les images observées suggèrent alors une analogie avec les aspects décrits sous le nom de «pseudo-amitoses» (Politzer[2] et Dietrich[3]).

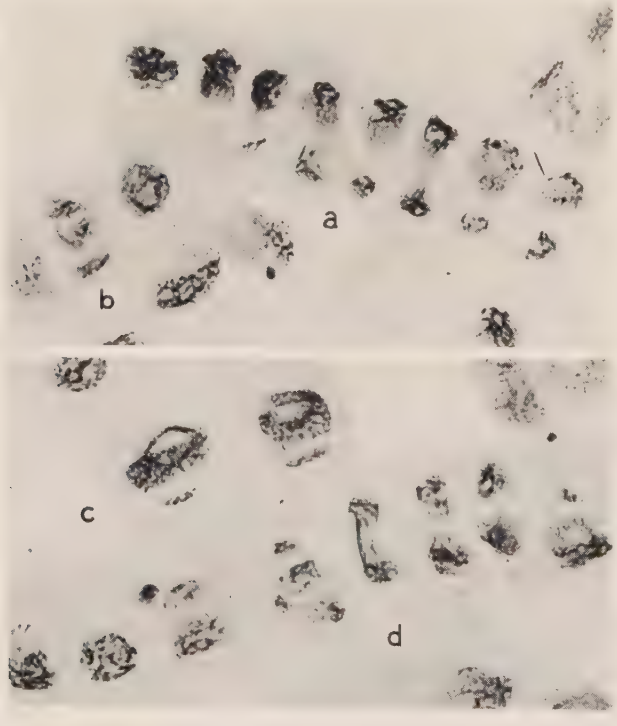


Fig. 2. Files de cellules avec divers aspects de la séparation des noyaux quiescents.

[2] G. Politzer, *Pathologie der Mitose*, Protoplasma Monograph. 7 (Borntraeger, Berlin 1934).

[3] J. Dietrich, *Quelques aspects de l'agglutination chromatique*, Congrès de l'A.F.A.S. (Dijon 1956), sous presse.

Dans les files de cellules que l'étalement n'a pas dissociées, tous les noyaux se trouvent simultanément en voie de disjonction, leur écartement est sensiblement de même importance: pour l'ensemble des cellules le mouvement est synchrone (Fig. 2a).

Le plan de partage est unique pour les noyaux d'une même file; son image apparaît dans le champ du microscope comme une ligne continue, droite ou légèrement sinueuse, coupant dans chaque cellule le noyau au hasard. Parfois le plan de disjonction se trouve dédoublé: les noyaux subissent alors un double étirement et sont coupés en trois (Fig. 2b et d).

Ce partage s'accompagne d'un véritable cloisonnement des cellules: souvent apparaît une membrane semblable à un phragmoplaste, parfois avant la séparation complète des deux parties du noyau, dans certains cas même, avant qu'un partage du noyau devienne visible.

L'ensemble du phénomène se présente donc comme une division de noyaux à l'état quiescent; le partage se fait comme s'il existait un véritable fuseau dont l'existence est associée à la cinétique d'une caryocinèse normale: la figure observée évoque le mouvement anaphasique de chromosomes entiers. Le synchronisme des divisions, sur un plan de disjonction, unique pour toute une rangée de cellules, suppose une intervention extérieure à chacune d'elles, une action précise, selon une topographie déterminée pour l'ensemble de la file. On songe à l'influence possible d'une ligne remarquable, celle de la rencontre des cloisons cellulaires (Schéma fig. 3). A partir de cette génératrice paraît se constituer un plan de disjonction qui coupe les noyaux au hasard; suivant ce plan, une membrane de néoformation est très visible dans certaines plages de cellules.

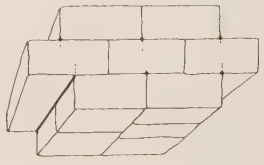


Fig. 3. Schéma d'interprétation.

Dans le déroulement de ce phénomène singulier, certains évènements d'une caryocinèse normale semblent se réaliser au niveau des éléments achromatiques: fuseau et phragmoplaste inducteur de cytocinèse, alors que ne se manifeste aucune évolution prophasique au niveau du matériel chromatique.

J. Dietrich

Institut de Botanique de l'Université de Strasbourg (France), le 10 décembre 1957.

Zusammenfassung

Bei *Ornithogalum umbellatum* findet sich in einzelnen Wurzelspitzen eine allgemein auftretende anomale Zweiteilung des Ruhekerns. Sämtliche Zellen einer Zellenreihe vollziehen die Teilungen synchron. Die getrennten Kernhälften liegen beiderseits einer Ebene, welche die Zellreihe in ihrer Längsrichtung durchschneidet.

Fluorescent Mast Cell in Precancerous Mouse Skin

One of the results of painting the skin of mice with tar or a carcinogenic hydrocarbon is the gradual development of a mast cell reaction in the altered dermis[1]. Despite some evidence to the contrary[2], such mast cells are said to exhibit a golden-brown fluorescence in ultra-violet light[3].

While investigating this problem, using fresh tissue spreads or frozen material unfixed in any other way, it was observed that the golden-brown fluorescence appears in the mast cells of the precancerous dermis only after treatment with formalin, and that a non-fluorescent precursor substance can be extracted from the mast cells by prolonged immersion of the tissue in acetone.

Since we[4] have recently confirmed the findings of others[5] that the mast cells of the mouse (and rat) are exceptional in containing not only histamine, but also 5-hydroxytryptamine (5-HT), it seemed of interest to discover whether the fluorescent material in precancerous skin is 5-HT which can be converted into a fluorescent β-carboline derivative by the action of formaldehyde[6].

Twenty four stock mice of either sex were painted twice, 7 days apart, along the entire length of the back with an 0·5% solution of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in acetone. 3 months later the mice were killed and the treated portions of skin excised. Vertical and horizontal frozen sections, free-hand sections and tissue spreads prepared from dermal scrapings, with or without additional fixation in 10% formalin, were examined under the microscope in ultra-violet light and then stained either with toluidine blue for mast cells, or with acetylated Sudan black for phospholipids[7]. These histological experiments confirmed that most of the golden-brown fluorescence in the mast cells of precancerous mouse skin is due to the action of formaldehyde on a substance which can be extracted with acetone. Treatment with acetone did not affect the ability of the granules to stain with either toluidine blue or with acetylated Sudan black.

The chemical identity of the fluorescing substance was arrived at as follows. Dermal scrapings from ten other treated skins were homogenized in acetone, and the extract was concentrated *in vacuo*. Fats were removed with petroleum ether. The final extract, when treated with formaldehyde, exhibited a golden-brown fluorescence in ultra-violet light, similar to that seen in the tissues, and having its maximum around 2800 Å. Further extraction of the skins with fat solvents failed to yield additional material giving the characteristic fluorescence. Chromatographic examination of the original acetone concentrate, as described in detail elsewhere[4], indicated that the fluorescing substance is 5–HT.

There is now ample evidence that mast cells in general are rich in histamine[8]. Just why the mast granules of the mouse and rat manufacture or store a second amine, 5–HT, is unknown. Work is in progress to trace the source of this 5–HT which, in the mast cells of precancerous mouse skin, reaches a concentration normally achieved only by the cells of the enterochromaffin system[9].

The possibility remains that some, at least, of this 5–HT is derived, directly or indirectly, from the precancerous epidermis itself and that the elucidation of the problem may shed light on a chain of events, which, in the mouse (and rat), is prone to end in the development of cancer.

J. F. Riley

Department of Radiotherapy, Royal Infirmary, Dundee (Scotland), December 23, 1957.

Résumé

L'application d'un hydrocarbure cancérigène à la peau de la souris est suivie d'une mastocytose très nette qui évolue dans le tissu conjonctif. Après traitement au formaldéhyde d'une coupe gelée, quelques mastocytes prennent au microscope à fluorescence une couleur brun doré. Par essai direct et par chromatographie sur papier, on a constaté que la substance fluorescente est le dérivé β-carboline de la 5-hydroxy-tryptamine.

[1] W. Woglom, Arch. Path. *2*, 533 and 709 (1926).
[2] H. Holmgren and G. Wohlfart, Cancer Res. *7*, 686 (1947).
[3] W. Cramer and W. L. Simpson, Cancer Res. *4*, 601 (1944). – W. L. Simpson in *Connective Tissue in Health and Disease* (Ed. G. Asboe-Hansen, Copenhagen, Munksgaard 1954), p. 225.
[4] R. Cass, P. B. Marshall, and J. F. Riley, J. Physiol. (to be published).
[5] E. P. Benditt, Ruth L. Wong, Margaret Arase, and Elizabeth Roeper, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *90*, 303 (1955). – G. B. West and J. R. Parratt, Arch. dermatol. *76*, 336 (1957).
[6] R. Barter and A. G. E. Pearse, J. path. Bact. *69*, 25 (1955). – J. B. Jepson and B. J. Stevens, Nature *172*, 772 (1953).
[7] W. G. B. Casselman, Q. J. microsc. Sci. *95*, 321 (1954).
[8] J. F. Riley and G. B. West, J. Physiol. *120*, 528 (1953).
[9] E. P. Benditt and Ruth L. Wong, J. exp. Med. *105*, 509 (1957).

Beobachtungen über Fälle von frühzeitiger Trächtigkeit bei der Albino-Maus

Die Geschlechtsreife der weiblichen Albino-Maus kündet sich durch verschiedene Erscheinungen an: Eröffnung des Vaginalverschlusses, erster Oestrus, erste Begattung, erste Trächtigkeit. Diese Erscheinungen treten nicht ganz gleichzeitig auf und bedingen einzeln noch nicht die volle Geschlechtsreife. Der Vaginalverschluss wird bei der Maus nicht, wie vielfach angegeben wird[1], durch eine Membran gebildet, sondern durch einen weit in die Vagina hineinragenden soliden Gewebepfropf (Bloch[2]), Abbildungen 1 und 2. Die ersten Begattungen führten nach Mirskaia und Crew[3] nur in 24% der Fälle zur Trächtigkeit, während bei 3–6 Monate alten Weibchen der Prozentsatz 80–90 betrug. Da die jungen Mütter oft den ersten Wurf fressen oder selber bei oder unmittelbar nach dem Wurf sterben, nehmen diese Autoren an, dass der jugendliche Organismus für die Produktion und Aufzucht der Jungen nicht reif ist, und definieren die Geschlechtsreife als die Fähigkeit, lebensfähigen Nachwuchs zu erzeugen und aufzuziehen. Dass die erste Aufzucht oft nicht gelingt, konnte ich bei der Maus häufig beobachten.

Kirkham[4] gibt für die Geschlechtsreife der Maus 6 Wochen an, Parkes[5] für die Eröffnung der Vagina das Ende der 7. Woche, für die erste Ovulation den 56. Tag. Engle

[1] G. D. Snell, in *Biology of the Laboratory Mouse* (The Blakiston Company, Philadelphia 1941), p. 55.
[2] Suzanne Bloch, Verh. Schweiz. Naturf. Ges. Basel *136*, 135 (1956).
[3] L. Mirskaia und F. A. E. Crew, Proc. Roy. Soc. Edinburgh *50*, 179 (1930).
[4] W. B. Kirkham, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *17*, 196 (1920), zit. in L. Mirskaia und F. A. E. Crew, Proc. Roy. Soc. Edinburgh *50*, 179 (1930).
[5] A. S. Parkes, J. Roy. micro. Soc. *45*, 315 (1925), zit. in Mirskaia und Crew[3].

und Rosasco[6] stellen die Eröffnung der Vagina am 28. bis 49. Tage fest (Durchschnitt 35. Tag), Mirskaia und Crew[3] geben für die Erlangung der Pubertät, nach diesen Autoren die Fähigkeit zur Produktion funktioneller Gameten und zur Begattung, den 34. Tag an. Snell[1] gibt für die erste Begattung 7–10 Wochen an und nennt 39 Tage ausnahmsweise früh. Die Männchen erlangen nach ihm die Geschlechtsreife ungefähr gleichzeitig mit den Weibchen, eher etwas später.

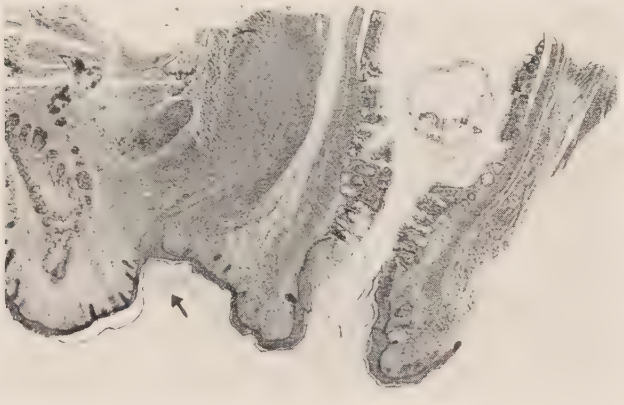


Abb. 1. Schnitt durch die Vagina eines 5 Tage alten Weibchens.

Im Vergleich mit diesen Angaben scheint es mir erwähnenswert, dass ich bei der Laboratoriumsmaus einige Fälle von ausnahmsweise früher Trächtigkeit beobachten konnte. Obwohl es sich um Einzelfälle unter Hunderten von Beobachtungen handelt, zeigen sie doch, dass ein ganz jugendlicher Organismus fähig sein kann, die Fortpflanzung mit Erfolg durchzuführen.

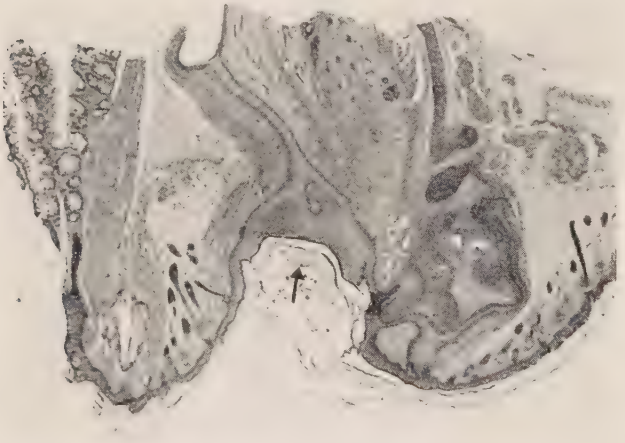


Abb. 2. Schnitt durch die Vagina eines 10 Tage alten Weibchens.

3 junge Weibchen, Wurfgeschwister, wurden von ihren männlichen Wurfgeschwistern begattet:

Ein Weibchen warf mit 43 Tagen ein Junges, wurde also mit 24 Tagen von einem 24 Tage alten Männchen befruchtet. Wahrscheinlich war der Wurf grösser gewesen und zum Teil gefressen worden.

Das zweite Weibchen warf mit 45 Tagen 10 Junge, von denen es später einen Teil frass, es wurde also mit 26 Tagen von einem gleichaltrigen Männchen begattet.

[6] E. T. Engle und J. Rosasco, Anat. Rec. *36*, 383 (1927).

Das dritte Weibchen warf mit 56 Tagen 14 Junge, es wurde also am 36. Tage von einem gleichaltrigen Männchen begattet.

Die Mutter dieser frühreifen Jungen wurde erneut trächtig nach Begattung durch eines ihrer männlichen, 28 Tage alten Jungen.

Zwei weitere Weibchen, ebenfalls Wurfgeschwister, wurden von ihren männlichen Wurfgeschwistern begattet am 22. Tage, wurden trächtig und zogen ihre Jungen auf.

Zwei Muttertiere wurden von ihren eigenen Jungen begattet, eines am 34., eines am 38. Tage, beide warfen 9 Junge und zogen sie auf.

Es sei noch erwähnt, dass bei den von mir beobachteten Jungen im allgemeinen die Vagina am 15. Lebenstage schon eröffnet war.

Der Zeitpunkt der Geschlechtsreife hängt von genetischen Faktoren und von den Zuchtbedingungen ab. Da es sich bei den hier mitgeteilten Fällen meistens um Wurfgeschwister handelt, ist anzunehmen, dass die genetischen Faktoren eine nicht zu unterschätzende Rolle spielen.

Da die Laktation bei der Maus vier Wochen dauert[6], so kann man sagen, dass in einem Teil der beobachteten Fälle noch säugende Junge von gleichaltrigen Männchen begattet wurden. Wenn eine solche Frühreife auch nicht die Regel ist, so zeigt ihr Vorkommen doch die Möglichkeit, dass ein noch nicht ausgewachsener Organismus schon imstande sein kann, lebensfähigen Nachwuchs zur Welt zu bringen und aufzuziehen. Die Periode der «adolescent sterility»[7] wird bei diesen Tieren übersprungen.

Suzanne Bloch

Zoologische Anstalt der Universität und Universitätsfrauenklinik, Basel, 5. Februar 1958.

Summary

The author reports several cases of mice, aged 3 to 4 weeks and still suckling, which mated with litter-mates and became pregnant. Some of these young females gave birth to large litters which they suckled and reared.

[7] M. F. Ashley-Montagu, Quart. Rev. Biol. *14*, 13, 192 (1939); *Adolescent Sterility* (Thomas Springfield, 1946), zit. in: P. Eckstein, *Old Age in the Modern World* (Edinburgh and London 1955), p. 190.

Photopic Sensitivity Mediated by Visual Purple

While studying the course of dark adaptation of visual purple elements in the guinea pig's eye, Granit[1] found two different types of rod responses. One resembling cones exhibited only a small increase in sensitivity during the first few minutes; the other resembling 'ideal' rods closely reflected the course of visual purple regeneration. Sloan[2] presented definite evidence of two independent rates of dark adaptation in totally color blind humans (human achromats) and a luminosity curve of the fovea which was very similar to that which would be expected if only scotopic receptors were active.

Besides using the differences in either the rate of dark adaptation or the luminosity function to separate rod and

[1] R. Granit, Acta physiol. Scand. *7*, 216 (1944).
[2] L. Sloan, J. opt. Soc. Amer. *44*, 117 (1954).

cone activity, differences in flicker fusion frequency can be used. In accord with the Duplicity theory of vision, a low fusion frequency (upper limit 20–30 fls./s) has always been found when the rod system is supposed to be operating whereas a high fusion frequency (in mammals

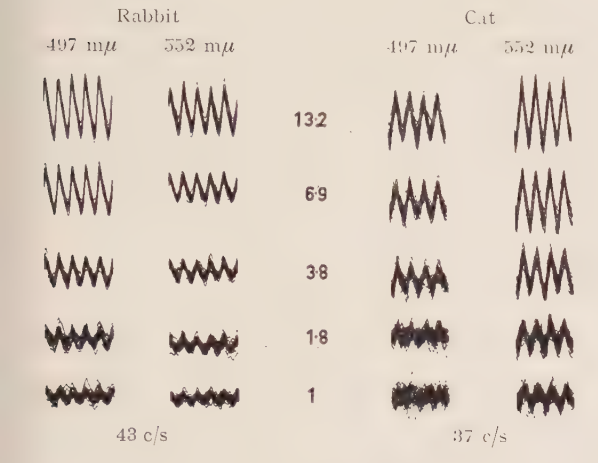


Fig. 1. – Photopic flicker potentials (superimposed oscillographic records) from the eye of albino rabbit and cat. Relative intensities 1·0 (497 mμ) and 1·335 (552 mμ) respectively. Frequencies of intermittent light and relative number of quanta as indicated; a.c. amplification.

between 30–70 fls./s) has been the rule when the cone system is in operation. The rabbit's retina contains a predominance of rods but a sufficient number of cones to show ERG flicker fusion frequencies as high as 30–70 fls./s (Fig. 1). These frequencies were seen in both pigmented and albino rabbits but because the threshold in the latter was considerably lower due to the high reflectivity of the fundus it facilitated experimental investigation.

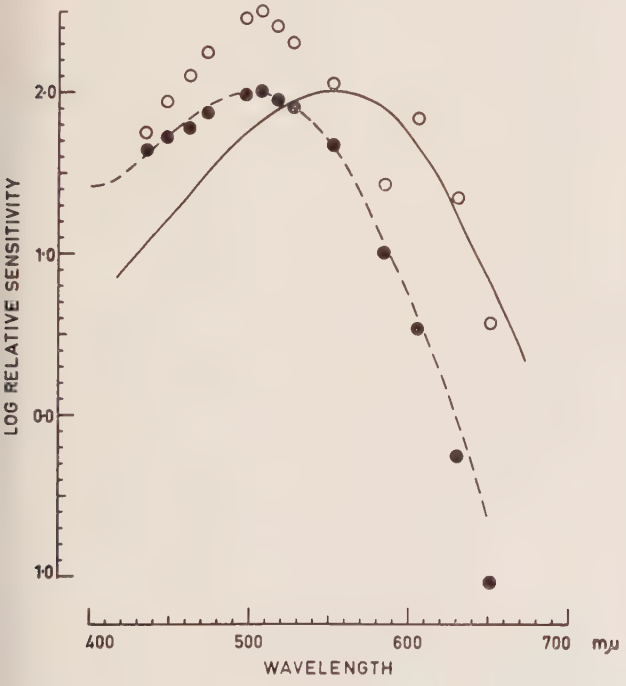


Fig. 2. – Relative spectral sensitivity (means of three experiments) of albino rabbit during high frequency stimulation. Open circles before, filled circles after correction for the reflectivity of the albino fundus. Dashed line visual purple absorption. For comparison the photopic sensitivity of the cat's eye during fast flicker is shown by continuous line.

High constant rates of intermittent stimulation and light adaptation were used to measure the spectral sensitivity between 435–650 mμ for albino rabbits using a high pressure xenon lamp and double interference filters. Contrary to recent findings in the cat's eye[3] where under the same experimental conditions a curve with a maximum at 556 mμ was found (cf. Fig.1 and 2), the relative spectral sensitivity of albino rabbit's eye (Fig. 2 open circles) is practically the same as in dark adaptation with a maximum at about 500 mμ. After an allowance has been made for the diffuse reflection of the albino fundus[4], the resulting agreement between the sensitivity data and the absorption spectrum of Rhodopsin[5] (Fig. 2) strongly supports the conclusion that this pigment is responsible for the spectral sensitivity of albino rabbit's eye under both photopic and scotopic conditions. Thus, evidence is presented that for the rabbit's eye the cones are governed by visual purple absorption.

E. Dodt and J. B. Walther

W. G. Kerckhoff-Herzforschungsinstitut der Max-Planck-Gesellschaft, Bad Nauheim, December 10, 1957.

Zusammenfassung

Bei Reizung der helladaptierten Kaninchen-Netzhaut mit intermittierenden Lichtreizen werden elektroretinographisch Fusionsfrequenzen bis etwa 70/s, das heisst deutliche Zapfenfunktion, registriert. Die hierbei gemessene spektrale Netzhaut-Sensitivität zeigt im Gegensatz zu den unter gleichen Versuchsbedingungen an der Katzen-Netzhaut erhobenen Befunden keine Purkinje-Verschiebung, sondern folgt der Absorptionskurve des Sehpurpurs.

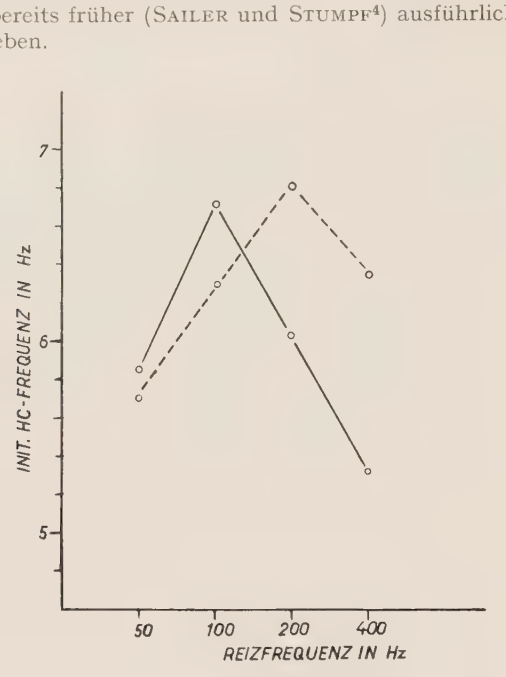
[3] E. Dodt and J. B. Walther, Pflügers Arch. *266*, 175 (1958).
[4] E. Dodt and J. B. Walther, Pflügers Arch. *266*, 187 (1958).
[5] G. Wald, Docum. ophthalm. *3*, 94 (1949).

Bestimmung der optimalen Reizparameter bei Reizung des aszendierenden retikulären Systems

Zur quantitativen Bestimmung der Wirksamkeit einer elektrischen Reizung des aszendierenden retikulären Systems (Moruzzi und Magoun[1]) kann die initiale Frequenz der «rhinencephalen arousal reaction» (RAR) (Jung und Kornmüller[2]; Green und Arduini[3]) herangezogen werden; zwischen dem Logarithmus der Spannung der retikulären Reizung und dieser Frequenz besteht eine positive lineare Korrelation (Sailer und Stumpf[4]). Unter Zuhilfenahme dieses Kriteriums haben wir nunmehr die optimalen Parameter der Reizung des aszendierenden retikulären Systems bezüglich der Auslösung einer arousal reaction bestimmt.

[1] G. Moruzzi and H. W. Magoun, EEG Clin. Neurophysiol. *1*, 455 (1949).
[2] R. Jung und A. E. Kornmüller, Arch. Psychiatr. *109*, 1 (1939).
[3] J. D. Green and A. Arduini, J. Neurophysiol. *17*, 533 (1954).
[4] S. Sailer und Ch. Stumpf, Arch. exp. Path. Pharmak. *231*, 63 (1957).

Methodik. An 8 wachen, nicht curarisierten Kaninchen wurde das EEG nach der von Monnier und Laue[5] beschriebenen Methode bipolar vom Neocortex und vom dorsalen Rhinencephalon abgeleitet und das aszendierende retikuläre System in der Höhe der vorderen Vierhügel gereizt. Weitere Einzelheiten der Methodik wurden von uns bereits früher (Sailer und Stumpf[4]) ausführlich beschrieben.



Abhängigkeit der initialen Frequenz der rhinencephalen arousal reaction (Ordinate) von der Frequenz der retikulären Reizung (Abszisse) bei einer Einzelimpulsdauer von 0,5 ms (– – –) und 1,5 ms (———). Jeder Punkt stellt einen Mittelwert aus 4×4 Einzelwerten dar (4 Tiere, je 4 Reizungen).

Die Frequenz der zur Reizung verwendeten Impulsserien betrug 50, 100, 200 und 400 Hz. Die Einzelimpulsdauer betrug bei 4 Tieren 0,5 ms, bei 4 weiteren Tieren 1,5 ms. In jedem Versuch wurde die Einzelimpulsdauer und die Spannung (1–6 V) konstant gehalten und die Reizfrequenz variiert, und zwar wurden pro Versuch je 16 Reizungen durchgeführt, wobei die 4 Reizfrequenzen in Form von 4 «Blöcken mit zufälliger Anordnung» (Linder[6]) zur Anwendung kamen. Die Dauer der einzelnen Reizungen betrug 5 s, das Intervall zwischen den einzelnen Reizungen 5 min. Die initiale Frequenz der RAR wurde wie folgt bestimmt: Es wurde – beginnend nach einem Intervall von 0,33 s nach Reizbeginn – der Abstand zwischen der ersten und zehnten regelmässigen Welle ausgemessen und diese Länge in Hz umgerechnet.

Ergebnisse und Diskussion. Die optimale (das heisst die die höchste initiale Frequenz der RAR auslösende) Reizfrequenz betrug bei Verwendung einer Einzelimpulsdauer von 0,5 ms immer 200 Hz und bei Verwendung einer Einzelimpulsdauer von 1,5 ms immer 100 Hz (Abb.). Die Unterschiede zwischen den mit Reizungen verschiedener Frequenz erhaltenen Effekten erwiesen sich als statistisch gesichert (6 Versuche: $P < 0{,}001$; 2 Versuche: $0{,}05 > P > 0{,}01$). Die Abbildung zeigt ausserdem, dass bei den niedrigeren Reizfrequenzen (50–100–200 Hz bei einer Einzelimpulsdauer von 0,5 ms) zwischen dem Logarithmus der Reizfrequenz und der initialen Frequenz der RAR eine praktisch lineare Korrelation besteht. In früheren Versuchen (Sailer und Stumpf[4]) liess sich eine gleichartige lineare Korrelation auch zwischen dem Logarithmus der Reizspannung und der initialen Frequenz der RAR nachweisen. In beiden Fällen besteht somit zwischen dem Logarithmus der zur Reizung verwendeten Elektrizitätsmenge pro Zeiteinheit und der initialen Frequenz der RAR die gleiche Beziehung. Während jedoch bei einer Erhöhung der Spannung (bei konstanter Einzelimpulsdauer und Reizfrequenz) niemals eine Abnahme der Reaktion beobachtet werden konnte, ist dies bei Erhöhung der Reizfrequenz (bei konstanter Einzelimpulsdauer und Reizspannung) der Fall.

Ch. Mayer und Ch. Stumpf

Pharmakologisches Institut der Universität Wien, 16. Dezember 1957.

Summary

For the initiation of an arousal reaction, the stimulation of the reticular activating system by square waves of frequencies varying from 50 to 400 c/s was studied. To evaluate the stimulation efficiency, the initial frequency of the rhinencephalic arousal reaction was used. The optimal stimulus frequency depends on the duration of the pulses. The optimal frequency was found to be 200 c/s at a pulse duration of 0·5 ms and 100 c/s at a pulse duration of 1·5 ms.

Effect of Electroshock upon Nucleic Acid Concentrations in Various Parts of Cat Brain

In a previous paper[1] we were able to demonstrate significant differences in the ribonucleic acid (RNA) concentrations in various regions of the central nervous system (CNS). In 1943 Hydén[2] observed an intracellular loss of RNA after electric stimulation of the spinal ganglion cells. This stimulated the experiments presented in this communication.

Region of brain	Control γ/10 mg of dried tissue	Electroshock γ/10 mg of dried tissue
Frontal cortex	299·0 ± 27·6	223·0 ± 14·1
Occipital cortex	303·4 ± 28·7	234·8 ± 15·7
Temporal cortex	305·6 ± 11·0	241·6 ± 3·2
Hippocampus	290·3 ± 27·8	218·0 ± 31·8
Cerebellar cortex	337·6 ± 23·9	258·6 ± 13·7
Cerebral white matter	148·8 ± 11·4	121·4 ± 22·3
Caudate nucleus	282·2 ± 19·1	211·5 ± 26·1
Thalamus	232·4 ± 22·7	162·3 ± 14·6
Hypothalamus	265·0 ± 23·1	193·0 ± 34·7
Midbrain	206·1 ± 15·1	152·3 ± 32·7
Pons	168·0 ± 19·3	153·7 ± 15·4
Medulla	170·1 ± 7·4	136·5 ± 19·5
Spinal cord	140·2 ± 11·1	113·3 ± 16·5

Adult cats maintained for several days under standard laboratory conditions have been used in the experiments. The 'Elehma' electroshock apparatus was employed. Shocks of 150 V were applied for 0·9 s through the elec-

[5] M. Monnier und H. Laue, Helv. physiol. Acta *11*, 73 (1953).

[6] A. Linder, *Planen und Auswerten von Versuchen* (Birkhäuser, Basel 1953).

[1] Lj. Mihailović, B. D. Janković, M. Petkovič, and D. Mančić, Exper. *14*, 9 (1958).

[2] H. Hydén, Acta physiol. Scand. *6*, Suppl. 17 (1943).

rodes placed on both temporal regions of the skull. The effect of a single electroshock, i.e. tonic-clonic convulsions was complete in all cases. Animals were decapitated min after the last convulsion. The details concerning the procedure of obtaining the samples of various regions of the brain, as well as the methods used for determinations of deoxyribonucleic (DNA) and ribonucleic acids, have been already indicated in the previous paper[1].

Results are presented in the Table. The samples of all investigated regions showed a pronounced decrease in the RNA content. No quantitative differences in the decrease of RNA could be found between the animals which received one electroshock, and those which received four successive electroshocks applied with an intershock interval of 7 min. The values of DNA observed in the various regions of the CNS after electroshock were found to be within the range of those obtained in normal animals.

Lj. Mihailović, B. D. Janković, M. Petković, and K. Isaković

Institute of Pathological Physiology, Medical School, and Microbiological Institute, School of Pharmacy, University of Belgrade (Yugoslavia), December 30, 1957.

Zusammenfassung

Beim Elektroschock kommt es zu bedeutenden Erniedrigungen der Konzentration von RNA in verschiedenen kortikalen und subkortikalen Teilen des zentralen Nervensystems der Katze, während sich die Konzentration von DNA in normalen Grenzen hält.

The Action of Tranquilizing Drugs on Brain Metabolism

In a previous paper[1], we reported experiments indicating a complex biochemical mechanism to be involved in the central effects of Chlorpromazine and other central ganglionic blocking agents. Two inhibitory processes have been demonstrated as necessary for a chlorpromazine-like pharmacological action: (a) uncoupling of oxydative phosphorylation and (b) simultaneous inhibition of ATPase activity.

Chlorpromazine has been reported to have beneficial effects in some psychotic disturbances[2]. The same holds for Miltown (Meprobamat)[3] and Benactyzin[4], while Captodiamin (Covatin), a substance with an even more pronounced «narcobiotic» effet than Chlorpromazine[5], was found to have only a sedative action[6].

The present work was undertaken to investigate: (a) whether these drugs with chlorpromazine-like action influence brain metabolism in a similar way as chlorpromazine, and (b) whether the metabolic effects of Captodiamin differ from those of Chlorpromazine, Benactyzin and Miltown.

Oxydative phosphorylation and ATPase activity have been measured on rat brain homogenates, by the technique already described[7].

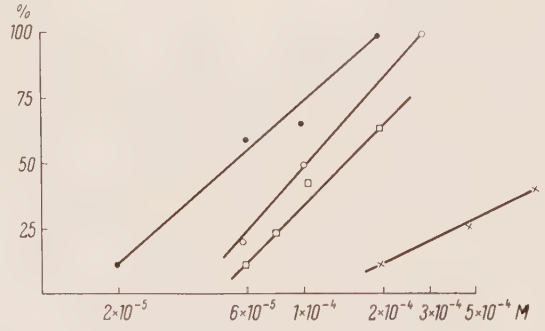


Fig. 1. – Inhibition of oxydative phosphorylation. Decrease in P/O ration as compared to controls plotted against the log of concentrations. ●–●–● = Captodiamin; ○–○–○ = Chlorpromazine; □–□–□ = Benactyzin; x–x–x = Miltown.

Figure 1 shows the effects of Chlorpromazin, Benactyzin, Miltown and Captodiamin on oxydative phosphorylation. All these compounds were found to have an uncoupling effect, the ID_{50} being $1{\cdot}05 \times 10^{-4}$ *M* for Chlorpromazine, $5{\cdot}5 \times 10^{-5}$ *M* for Captodiamin, $1{\cdot}6 \times 10^{-4}$ *M* for Benactyzin and $1{\cdot}1 \times 10^{-3}$ *M* for Miltown.

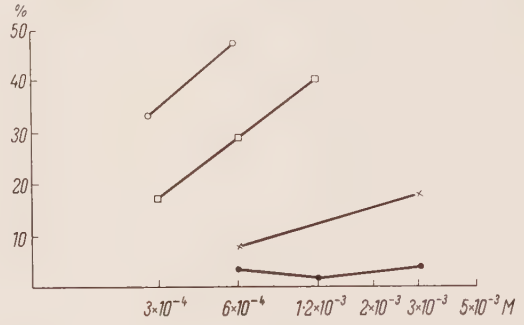


Fig. 2. – Inhibition of ATPase activity. Decrease in activity as compared to controls plotted against the log of the concentrations. ●–●–● = Captodiamin; ○–○–○ = Chlorpromazine; □–□–□ = Benactyzin; x–x–x = Miltown.

Figure 2 shows the effect of these drugs on the ATPase activity. Chlorpromazine, Benactyzin and Miltown exhibited a more or less pronounced inhibitory action, while Captodiamin was ineffective even in very large concentrations.

Benactyzin and Miltown thus influence the brain metabolism in the same way as Chlorpromazine, i.e. they inhibit both oxydative phosphorylation and ATPase activity. Captodiamin, on the contrary, inhibits only oxydative phosphorylation and leaves ATPase activity unchanged. This observation could be interpreted as indicating that uncoupling of oxydative phosphorylation may be involved in the 'action narcobiotique', but it does not

[1] L. Decsi, *Arzneimittelforschung* (in press).

[2] H. Kopera, Wiener klin. Wschr. *1955*, 867. – F. J. Ayd, in H. E. Himwich (Edit.) *Tranquilizing Drugs* (Amer. Assoc. for Advances of Science, Washington 1957).

[3] W. M. Pennington in H. E. Himwich (Edit.), *Tranquilizing Drugs* (Amer. Assoc. for Advances of Science, Washington 1957).

[4] I. Munkvad, I. Ostenfeld, and O. Jensen, cited by C. H. Holten and V. Larsen, Acta pharmacol. toxicol. (Kopenhagen) *12*, 346 (1956).

[5] Ph. Decourt, cited by P. Belot and Ph. Decourt, Ann. Médico-Psychologiques *1956*, p. 1.

[6] H. Werenberg, personal communication of Prof. P. Kopf. – A. von der Heydt, Med. Klinik *52*, 787 (1957). – O. H. Arnold, Wiener Med. Wschr. *106*, 510 (1956).

[7] L. Decsi, Arch. exp. Path. Pharmak. *230*, 547 (1957). – L. Decsi and J. Méhes, Arch. exp. Path. Pharmakol. *230*, 462 (1957).

suffice, by itself, for a chlorpromazine-like central action[8].

L. Decsi and J. Méhes

Institute of Pharmacology, Medical University, Pécs (Hungary), January 1, 1958.

Zusammenfassung

Die Tranquilizer Miltown (Meprobamat) und Benactyzin beeinflussen den Gehirnzellstoffwechsel *in vitro* qualitativ wie Largactil, das heisst, sie hemmen die oxydative Phosphorylierung und gleichzeitig auch die ATPase-Aktivität. Demgegenüber hemmt das bloss über eine sedative Wirkung verfügende Captodiamin (Covatin) nur die oxydative Phosphorylierung und lässt die ATPase-Aktivität unbeeinflusst. Dies spricht dafür, dass zur Auslösung einer largactilartigen Wirkung beide oberen Hemmungsprozesse notwendig sind.

[8] L. Decsi, *Arzneimittelforschung* (in press). – L. Decsi and J. Méhes, Arch. exp. Path. Pharmak. *230*, 462 (1957).

Inhibitory Action of Trypsin and Trypsin-Inhibitors on Experimental Inflammation in Rats

Parenterally administered trypsin appears to possess important anti-inflammatory action in animal experiments[1] and in clinical therapy[2]. However, much confusion seems to exist in our knowledge of the mechanism of its action and many facts point to the possibility that this action might be rather an indirect one. We have attempted to bring some light into this problem.

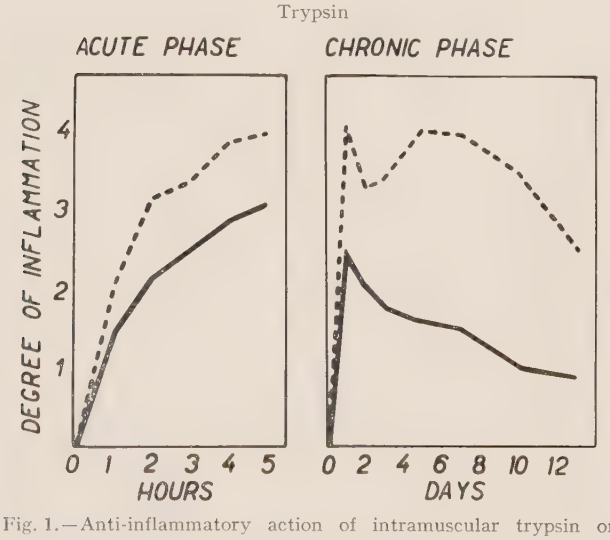


Fig. 1.—Anti-inflammatory action of intramuscular trypsin on kaolin-induced inflammation in rats. Both lines are mean values of responses in 10 animals. (Broken line: control).

To accomplish this, we reinvestigated first the anti-inflammatory action of a suspension of trypsin in oil applied intramuscularly in doses of 20 mg/kg to rats. The first injection was given 2 h before the induction of inflammation and the others followed every third day, 6 injections being given in all. The experimental inflammation was induced by subaponeural injection of 10% sterile kaolin suspension into the hind paw[3]. The evaluation of inflammation was based on the measurement of differences in the volume of the paw, differences in the diameter of the metatarsophalangeal joint and differences in abscess formation[4] (Fig. 1).

Trypsin revealed a statistically significant antiphlogistic influence in the acute phase of inflammation 5 h after administration of kaolin. Trypsin inhibited even more significantly the chronic phase of inflammation characterized by abscess formation which lasts more than a week.

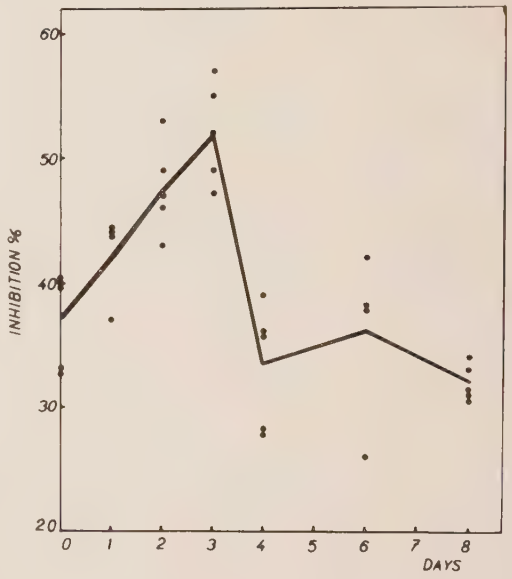


Fig. 2.—Plasmatic trypsin-inhibitory activity after intramuscular application of trypsin.

Subsequently we have tested the influence of parenteral trypsin on trypsin-inhibitory activity of rat serum in an attempt to confirm the experiments of Grob[5]. The degree of inhibition was expressed in percent of the trypsin activity after incubation with serum (Fig. 2). Trypsin suspension was applied in one dose (0·5 mg/kg) which is nearly in the range of clinical dosage. We noted, even after this low dose, a significant increase in the trypsin-inhibitors, the maximum being attained on the third day approximately. The original level of inhibitors was then quickly restored.

Evidence from this experiment led us to adopt a concept that the inhibitors of trypsin could provide for the mediation of the anti-inflammatory action of trypsin. Endogenous trypsin could furthermore participate in the defensive reaction of the organism against the proteolytic enzymes activated during the inflammation. These enzymes might be responsible for the greater part of basic elements of inflammation releasing locally active products

[1] J. M. Beiler, R. Brendel, and G. J. Martin, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *89*, 274 (1955).

[2] I. Innerfield, A. Angrist, and A. Schwarz, J. Amer. Med. Assoc. *152*, 597 (1953).

[3] J. Hillebrecht, Arzneimittelforschung *4*, 607 (1954).

[4] Z. Horáková, O. Němeček, J. Čtvrtník, and J. Mayer, Československ. Farmacie *7*, 1958 (in print).

[5] D. Grob, J. Gen. Physiol. *26*, 405 (1943).

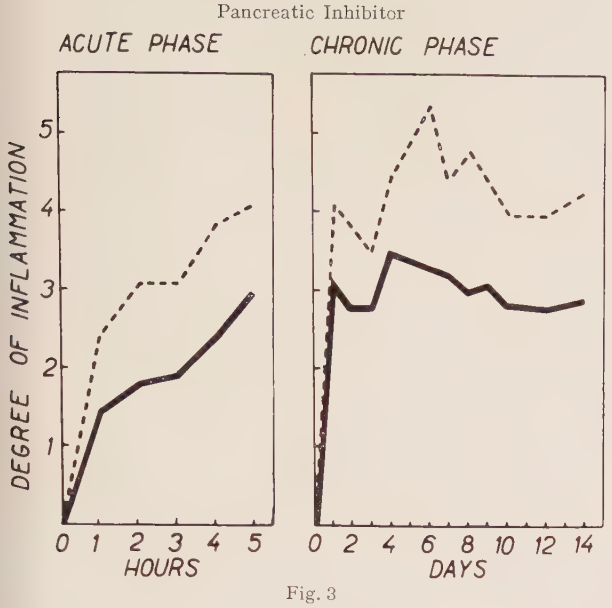


Fig. 3

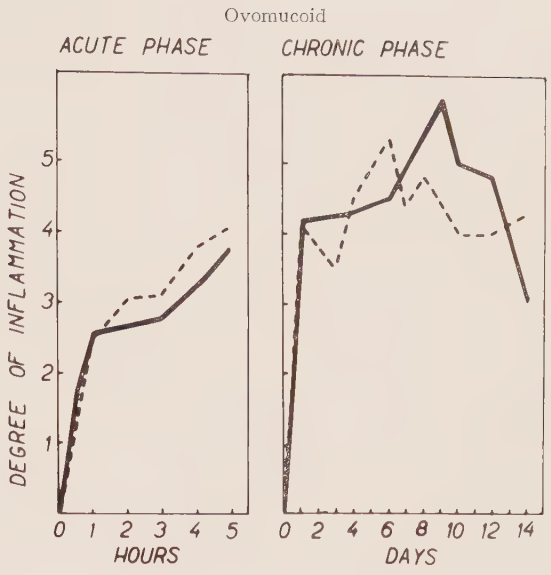


Fig. 4

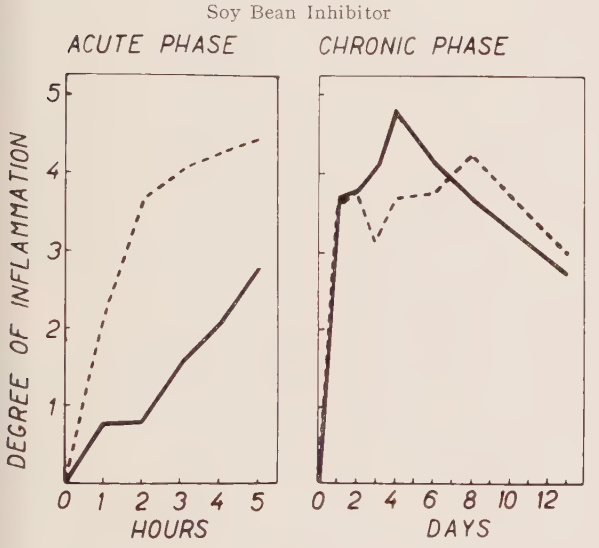


Fig. 5

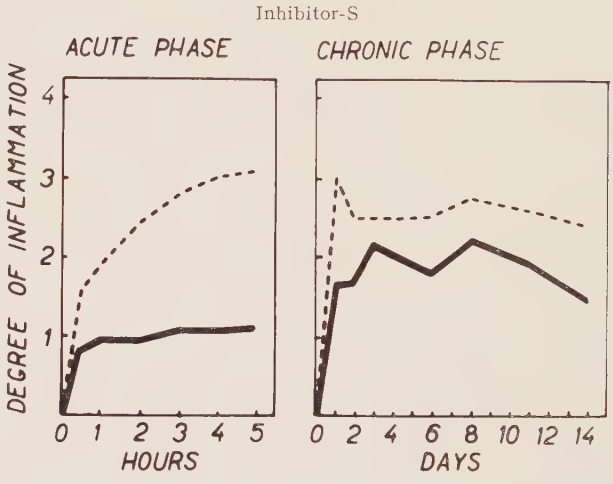


Fig. 6

Fig. 3, 4, 5, 6.—Anti-inflammatory action of trypsin-inhibitors on kaolin-induced inflammation in rats. Both lines are mean values of responses in 10 animals (broken line: control).

of protein breakdown, e.g. leucotaxin[6], bradykinin[7], pain-producing substance[8].

This concept was greatly substanciated by our experiments proving strong antiphlogistic action of several naturally occuring trypsin-inhibitors (Fig. 3, 4, 5, 6).

The inhibitors (pancreatic trypsin-inhibitor, soya bean trypsin inhibitor, inhibitor S and ovomucoid) were applied in 6 intraperitoneal injections (50 mg/kg). The first injection was given 20 min before the induction of inflammation, the second 6 h after and the others followed daily. 3 inhibitors (pancreatic, soya-bean and inhibitor S) revealed a highly significant inhibition of experimental inflammation whereas ovomucoid was ineffective. The inhibitors influenced particularly the acute phase of inflammation. As compared with the drugs of the phenylbutazone type, at least two inhibitors (soya-bean and inhibitor S) showed much higher antiphlogistic activity.

The inhibitors were proved highly active even in other types of experimental inflammation (the inflammation of the rabbits eye induced by mustard oil, skin inflammation in the rabbit induced by the same agent and generalized dextran edema in rats). These data and the results of the study of antiphlogistic action of chymotrypsin and its inhibition, which were quite analogous to the results with trypsin, will be dealt with in detail in another paper.

J. Hladovec, V. Mansfeld and Z. Horáková

Pharmaceutical and Biochemical Research Institute, Prague, November 26, 1957.

Zusammenfassung

Die entzündungshemmende Wirkung von einigen in der Natur vorkommenden Trypsin-Inhibitoren wurde an Ratten mit experimenteller Kaolin-Arthritis nachgewiesen. Die entzündungshemmende Wirkung von Trypsin könnte demzufolge auf eine durch die Applikation von Trypsin bedingte, reaktive Mobilisierung endogener Protease-Inhibitoren zurückgeführt werden.

[6] V. Menkin, J. exp. Med. *67*, 129 (1938).

[7] M. Rocha e Silva, Arch. int. Pharmacodyn. *88*, 271 (1951)

[8] J. B. Jepson, D. Amstrong, C. A. Keele, and J. W. Stewart, Biochem. J. *62*, 3 P (1956).

Die Wirkung des 6-Allyl-6,7-dihydro-5H-dibenz[c,e]azepins («Ilidar» Roche) auf die Glomerulardurchblutung des Kaninchens

Intravenös verabreichtes «Ilidar» Roche (6-Allyl-6,7-dihydro-5H-dibenz[c,e]azepin) macht bei Menschen und Hunden in einigen Fällen signifikante Erhöhung der renalen Plasmadurchströmung (Thölen, Bernstein und Gürtler[1]; Handley und Moyer[2]). Wie aus den Tierversuchen hervorgeht, ist die Verbesserung der Nierendurchblutung auf die, durch Ilidar bedingte, starke Verminderung des renalen Gefässwiderstandes zurückzuführen. Um die Wirkungsweise des Ilidar auf die Nierendurchblutung weiter abzuklären, wurde die Glomerulardurchblutung von Kaninchennieren nach Ilidar-Injektion mit Kontrollen verglichen.

Methode. Allgemeines Prinzip: Der fluoreszierende Farbstoff Thioflavin-S[3] wird unmittelbar nach intravenöser Injektion von den Gefässwänden aufgenommen. Die Blutgefässe sind im Ultraviolettlicht sichtbar. Auf diese Weise ist es zum Beispiel in der Niere möglich, die Glomerulardurchblutung zu untersuchen (Schlegel[4]; Schlegel und Moses[5]).

Durchführung: Nach 24stündigem Hungern wurden 2,5 bis 3,5 kg schwere Kaninchen mit 0,06 g/kg Dial intravenös narkotisiert. Fixierung einer Kanüle in einer der Vv. jugulares. Eröffnung der Bauchhöhle durch Medianschnitt. Umschlingen beider Aa. und Vv. renales mit je einem Faden, dessen Enden der geschlossenen Bauchwunde vorgelagert wurden. 30 min nach Schliessen der Bauchwunde intravenöse Injektion (Injektionsdauer 3 min) von

1. 1 ml/kg 0,9% NaCl-Lösung (Kontrollgruppe, 5 Tiere), oder
2. Ilidar-Lösung (Gruppe A: 2,5 mg/kg Ilidar; 4 Tiere. Gruppe B: 5 mg/kg Ilidar; 5 Tiere. Gruppe C: 10 mg/kg Ilidar; 2 Tiere, 3 Tiere sind unmittelbar nach der Ilidar-Injektion gestorben).

Nach 1 min intravenöse Injektion einer 4-prozentigen Thioflavin-S-Lösung (1 ml/kg in 3 s). 3 s später Unterbinden der Nierengefässe. Entnahme beider Nieren. Längsschnitt im Bereiche der grössten Zirkumferenz. Beleuchten der Schnittfläche mit Ultraviolettlicht. Zählen der Glomerula mit Hilfe eines Netz-Okularmikrometers. Pro Niere wurden 5 gleichmässig verteilte Rindenbezirke von 4,5 mm Länge und, je nach Ausdehnung der Nierenrinde, ungefähr 4 mm Tiefe ausgezählt. Die durchschnittliche Zahl der Glomerula wurde pro mm Nierenumfang berechnet.

Resultate. Aus der Tabelle geht hervor, dass zwischen der Dosierung des Ilidar und der Zahl der gegenüber den Kontrollen zusätzlich durchbluteten Glomerula eine statistisch gesicherte Abhängigkeit besteht. Bei 5 mg/kg Ilidar ist die maximale pharmakodynamische Wirkung des Ilidar auf die Glomerulardurchblutung erreicht.

Beziehung zwischen Dosierung des Ilidar und der Zahl der sichtbaren Glomerula.

Gruppe	Dosierung des Ilidar mg/kg	Anzahl der Tiere	Zahl der Glomerula pro mm der Rindenperipherie		
			Mittelwert	Standardabweichung	p*
Kontrollen	0	5	23 (1)	± 2,2	0,1
A	2,5	4	26 (1,16)	± 2,2	0,01
B	5	5	29 (1,26)	± 3,5	
C	10	2 (3)	29 (1,26)	—	

* Errechnet nach dem t-Test von Student.

Die Differenz zwischen den Werten beider Nieren des gleichen Tieres betrug durchschnittlich 8,5% des tieferen Wertes.

Diskussion. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die bei Hunden beobachtete Steigerung der Nierendurchblutung durch Ilidar. Ilidar bewirkt die Eröffnung vorher nicht durchbluteter Glomerula. Ob der bei einigen Patienten mit chronischer Nephropathie festgestellten Verbesserung der Nierendurchblutung durch Ilidar derselbe Wirkungsmechanismus zugrunde liegt, kann mit den vorliegenden Versuchen nicht entschieden werden.

U. Lanz und H. Thölen

Medizinische Universitätsklinik Basel, 26. November 1957.

Summary

In the rabbit, an injection of Ilidar significantly increases the number of glomerula participating in the circulation in comparison with controls.

[1] H. Thölen, A. Bernstein und A. Gürtler, Schweiz. med. Wschr. *85*, 1122 (1955).

[2] C. A. Handley und J. H. Moyer, J. Pharm. exp. Ther. *110*, 277 (1954).

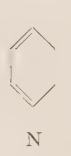
[3] Der Farbstoff Thioflavin-S wurde uns von Hartmann-Leddon & Co., Philadelphia, zur Verfügung gestellt.

[4] J. U. Schlegel, Anat. Rec. *105*, 433 (1949).

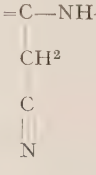
[5] J. U. Schlegel und J. B. Moses, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *74*, 832 (1950).

Hydrazide de l'acide cyanacétique et temps de saignement moyen chez le lapin

C'est en 1952 que l'hydrazide de l'acide isonicotinique (INH) fit son apparition dans la thérapeutique antituberculeuse. En cette même année, Valdecasas *et al.*[1], partant de l'hypothèse que l'activité tuberculostatique de l'INH ne dépendait pas de la présence du cycle azoté pyridinique, de toxicité élevée, mais plutôt de la position relative de l'azote pyridinique et de la chaîne latérale, aboutirent à la découverte de la cyanacétylhydrazide (CAH)[2]:



Isonicotylhydrazide (INH)



Cyanacétylhydrazide (CAH)

[1] F. G. Valdecasas *et al.*, Med. Clin. *4*, 275 (1952).

[2] En Suisse, l'étude expérimentale de Hartl[3] mit en évidence l'effet tuberculostatique de cette substance employée, depuis, dans la thérapie de la tuberculose pulmonaire et uro-génitale.

[3] W. Hartl, Schweiz. Z. Tuberk. *1*, 65 (1954).

Tableau I. Hydrazide de l'acide cyanacétique. Doses quotidiennes en mg/kg

50 mg/kg				100 mg/kg			
Lapin N°	T.S.M. au départ s	T.S.M. après 7 jours s	Différences s	Lapin N°	T.S.M. au départ s	T. S. M. après 7 jours s	Différences s
1	340	312	— 28	1	370	335	— 35
2	279	279	0	2	342	335	— 7
3	329	341	+ 12	3	237	336	+ 9
4	291	315	+ 24	4	357	317	— 40
5	384	354	— 30	5	390	381	— 9
6	325	315	— 10	6	312	324	+ 12
Moyennes	324	319	— 5	Moyennes	349	338	— 11

Etant donné l'analogie entre ces deux substances et l'effet hémorragipare signalé pour l'INH – que nous avons pu nous-mêmes contrôler expérimentalement[4] –, il nous a paru intéressant de vérifier également l'action éventuelle du CAH sur le temps de saignement moyen chez le lapin.

Méthode de travail. Nous avons utilisé des lapins adultes, pesant approximativement 2 kg, sans distinction de sexe, et avons déterminé les temps de saignement moyens (T. S.M.) des animaux par la technique de Roskam[5]. La mesure du temps de saignement s'effectue tout d'abord à l'oreille droite, avant l'administration de la substance, puis à l'oreille gauche, après le traitement. Nos essais ont été faits avec la substance pure d'hydrazide de l'acide cyanacétique, instillée en solution aqueuse par sonde œsophagienne. La durée du traitement a été fixée à 7 jours pour tous les animaux.

Résultats. Les résultats obtenus avec des doses de 50 mg/kg et de 100 mg/kg sont récapitulés dans le Tableau I.

L'examen de ces chiffres permet de déduire que la CAH ne produit pas de variations appréciables des temps de saignement moyens supérieurs aux erreurs inhérentes à la méthode de contrôle. Signalons, à titre comparatif, que l'administration, 7 jours durant, de doses variables d'INH détermine chez le lapin les modifications suivantes du temps de saignement:

Tableau II

Isoniazide (mg par kg et par jour)	Temps de saignement après 7 jours de traitement (fluctuations en %)
10	— 3
25	+ 18
50	+ 25
100	+ 64

En conclusion, l'hydrazide de l'acide cyanacétique ne provoque pas, aux doses utilisées, une prolongation des temps de saignement moyens chez le lapin, contrairement à ce qui se produit avec l'isoniazide.

A. Estève et J. Laporte

Laboratoire du Dr Estève, Barcelone (Espagne), par MM. A. Estève, Dr en Pharmacie, membre de la «Real Academia de Farmacia» et J. Laporte, Dr en Médecine, collaborateur du «Consejo Superior de Investigaciones Científicas», le 8 novembre 1957.

Summary

Having regard to the tendency to haemorrhage when isonicotine acid hydrazide treatment is being applied, the authors have endeavoured to verify whether such effect is also produced by cyanacetic acid hydrazide. The measure of the mean bleeding times of rabbits (Roskam method), at the dosage of 50 and 100 mg/kg, shows that the latter drug does not increase the same, differing in this from isonicotinic acid hydrazide.

[4] A. Estève et J. Laporte, Therapie *12*, 510 (1957).

[5] J. Roskam et M. Powen, Arch. inter. Pharmacodyn. *57*, 450 (1937).

Nachweis einer reflektorischen Natur der Jodazetat-Miosis

Jodazetat erzeugt in Dosen von 20 bis 40 mg/kg beim Säuger eine histologisch nachweisbare Schädigung der Photorezeptoren[1]. Bei Mikroelektrodenableitungen der Impulse von Einzelfasern des intrakraniellen N. opticus der Katze konnte festgestellt werden, dass nach intravenöser Jodazetatinjektion eine vorübergehende enorme Steigerung der Spontanaktivität auftritt, die von einer partiellen oder kompletten Auslöschung der gesamten visuellen Aktivität gefolgt ist[2]. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass dieser Erscheinung ein irreversibler Vorgang im Sinne einer Dauerdepolarisation retinaler Strukturen zugrunde liegt.

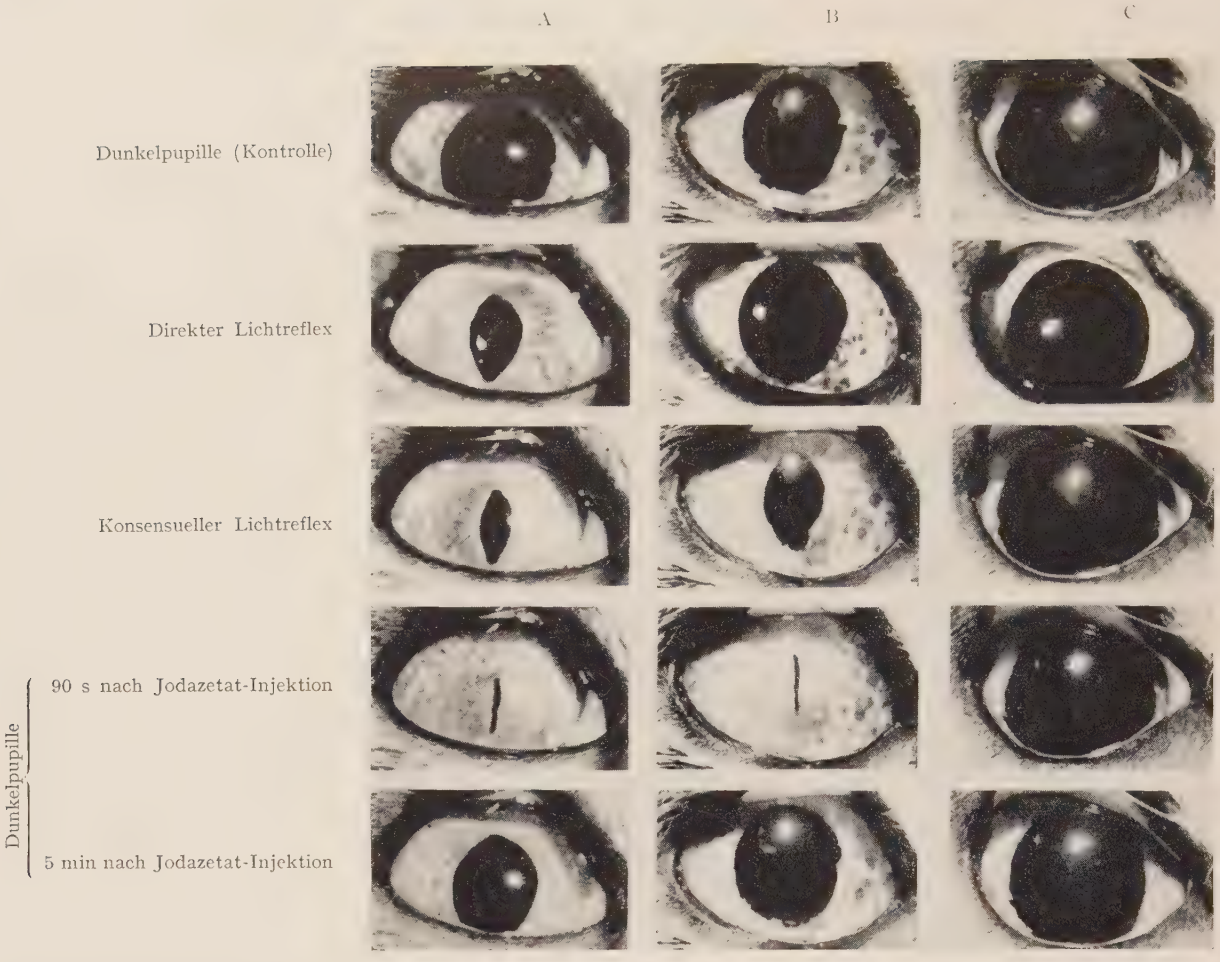
Unmittelbare Folge einer Jodazetatinjektion ist eine kurzdauernde maximale Pupillenverengung, die bereits von Noell[3] beobachtet und mit einer gesteigerten Aktivität retinaler Neurone in Zusammenhang gebracht wurde. In der vorliegenden Untersuchung wurde zunächst geprüft, ob die erwähnte Miosis tatsächlich über die Retina ausgelöst und damit reflektorischer Natur ist, oder ob sie auf einer direkten Wirkung des Jodazetats auf die Iris bzw. auf zentralen Effekten beruht. Im erstgenannten Fall war ferner die Frage zu untersuchen, ob die Pupillenverengung auf eine gesteigerte Lichtempfindlichkeit oder auf eine direkte Erregung der Retina durch Jodazetat zurückzuführen ist.

Die Versuche wurden bei 6 Katzen (2,30–2,90 kg) unter analogen Bedingungen durchgeführt, wie sie in den vorerwähnten elektrophysiologischen Untersuchungen[2] be-

[1] G. Schubert und H. Bornschein, Exper. *7*, 461 (1951). – W.K. Noell, J. cell. comp. Physiol. *40*, 25 (1952).

[2] H. Bornschein, Z. Biol. (im Druck).

[3] W. K. Noell, USAF Proj. Rep. No. 21-1201 0004 (1953).



Reaktion der rechten Pupille auf Licht bzw. auf intravenöse Injektion von 20 mg/kg Jodazetat. 3 Katzen.

A: Beide Augen intakt B: Rechter N.opticus durchschnitten C: Beide Nn. optici durchschnitten.

standen hatten (bei den Versuchen mit intracranieller Durchschneidung des N. opticus Präparation am «hängenden Gehirn» nach Schubert[1]; bei den Versuchen mit retinaler Ischämie intraokulare Druckänderung mit Leberscher Kanüle und äusserem Drucksystem); hingegen wurde im vorliegenden Fall eine Pupillenerweiterung durch Atropin unterlassen. Das Verhalten der Pupille des rechten Auges wurde mittels photographischer Blitzlichtaufnahmen verfolgt (Contax mit Contameter, Elektronenblitz Braun Hobby Automatic). Der Versuch wurde in einem vollkommen lichtdicht abgedunkelten Raum durchgeführt. Der zur Auslösung von Lichtreflexen benützte Lichtreiz entsprach $1{,}1 \cdot 10^3$ Lux (an Stelle des Auges), wobei die Pupillenaufnahme jeweils 4 s nach Einschalten des Lichtreizes erfolgte.

Intravenöse Injektion von 20 mg/kg Jodazetat in gepufferter neutraler Lösung verursachte eine extreme Miosis, die nach 90–100 s maximal ausgeprägt und nach 5 min weitgehend abgeklungen war. Die Miosis war auch bei kompletter Ausschaltung von Lichtreizen sowie nach einfacher Opticus-Durchtrennung nachweisbar, nicht aber hingegen nach doppelseitiger Ausschaltung des N. opticus (Abbildung). Demnach ist der untersuchte Effekt des Jodazetats nicht auf eine erhöhte Lichtempfindlichkeit der Retina zurückzuführen, sondern auf eine direkte retinale Erregung, die in Analogie zum Lichtreflex auch eine konsensuelle Pupillenreaktion zur Folge hat. Diese Schlussfolgerung wurde durch zwei weitere Versuche gestützt, bei denen das linke Auge statt durch Opticusdurchtrennung mittels temporärer Ischämie (intraokulare Druckerhöhung auf 200 mm Hg) ausgeschaltet wurde. In beiden Fällen konnte die prinzipielle Reaktionsfähigkeit der untersuchten rechten Pupille mit der konsensuellen Lichtreaktion noch kurz vor der Ischämie bzw. der Jodazetatinjektion kontrolliert werden. War gleichzeitig der rechte N. opticus durchtrennt, so trat nach der Jodazetatinjektion keine temporäre Miosis auf, wohl aber bei intaktem rechtem N. opticus. Im letztgenannten Fall bewirkte ferner die Wiederfreigabe der Durchblutung des linken Auges (3 min nach Jodazetatinjektion) eine erneute extreme Kontraktion der rechten Pupille als konsensuelle Reaktion auf die nunmehr in der Retina des Gegenauges einsetzende Jodazetatwirkung.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen mit den eingangs erwähnten elektrophysiologischen Befunden in vollem Einklang und zeigen, dass der durch Jodazetat verursachten Amaurose eine temporäre visuelle Erregung vorausgeht, die einer Blendung entspricht.

G. Schubert und H. Bornschein

Physiologisches Institut der Universität Wien, den 28. November 1957.

[1] G. Schubert, v. Graefes Arch. Ophthalm. *154*, 125 (1953).

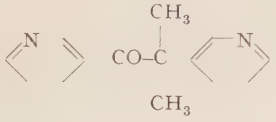
Summary

Intravenous administration of iodoacetate (20 mg/kg) produces in cats a transient miosis. This is shown to be a reflex constriction elicited by an excitatory action of iodoacetate on the retina.

New Amphenone Analogs as Adrenocortical Inhibitors

The synthesis of Amphenone B [3,3-di(p-aminophenyl)-butanone-2-dihydrochloride] by Allen and Corwin[1], with subsequent elucidation of its structure[2] and biological activities[3], led to attempts to obtain a compound which would retain the inhibitory effect of Amphenone B on the secretion of adrenal cortical hormones, but lack some of its other actions. As a result of these investigations, a number of pinacones were synthesized which inhibited adrenal function but differed in other important ways from Amphenone B. The one most thoroughly studied has been 2-methyl-1, 2-bis-(3-pyridyl)-1-propanone (Su 4885), which is the subject of this report.

The pinacone is prepared by first performing a bimolecular cathodic reduction on 3-acetylpyridine in a 1 N potassium hydroxide medium at a mercury cathode and a reference potential of −2·4 volts vs. S.C.E. The isolated pinacol[4] is rearranged by treatment with concentrated sulphuric acid to yield Su 4885, m.p. 50–51°, the structural formula of which is:



Biological Actions

(*A*) *Dogs.*—Both the free base and the ditartrate of Su 4885 were tested for adrenal-inhibiting activity by administration, either intravenously, *per os* or intragastrically, into dogs under Nembutal anesthesia in acute experiments of 2–4 h duration. In each case a cannula was inserted in the lumbo-adrenal vein in a fashion similar to that of Hume and Nelson[5]. At intervals, the entire blood flow through the adrenal vein was collected for two-minute periods and the 17-OH corticoid content measured by a modification of the method of Silber and Busch[6]. Using the various routes of administration in 19 dogs, doses of 10 to 300 mg/kg of either the free base or ditartrate caused in each case a fall in adrenal vein corticoids ranging from 25% to nearly 100% below pretreatment control values. The effects lasted from 1 to more than 4 h. A dose-response curve has not been established but the results suggest that increasing amounts both enhance and prolong the activity. 5 mg/kg intravenously of Su 4885 ditartrate reduced adrenal vein corticoids in 2 of 3 dogs; presumably this approximates the minimal effective dose.

In toxicology studies, the free base of Su 4885 was given orally twice per day to 2 dogs for 4 weeks in doses gradually increased to 200 mg/kg/day, and to 4 dogs for one week (200 mg/kg/day—equivalent to 2·3 times this amount of Su 4885 ditartrate). Adrenal insufficiency was not apparent but there was some ataxia, salivation and depression.

Terminal values for plasma sodium and potassium were in normal ranges but in these 6 treated dogs, terminal adrenal vein corticoids taken 2 h after the last dose of the drug were reduced as indicated in the Table.

An increase in adrenal weight of approximately 50% occurred over control values. This distinguishes the effects of Su 4885 from the adrenolytic action of the insecticide DDD [2,2-bis(para-chlorophenyl)-1,1-dichloroethane] which causes adrenal atrophy in dogs[7] and also suggests that the compound acts directly on the adrenal rather than by suppression of ACTH release. In contrast to Amphenone B and other closely related compounds, Su 4885 did not reduce adrenal blood flow while reducing corticoid secretion.

(*B*) *Rats.*—The effects of Su 4885 ditartrate were sharply distinguished from those of amphenone B by the absence of some amphenone-like actions in rats. In doses of 160 to 320 mg/kg, given either acutely or for 5 day periods by stomach tube, it did not cause adrenal, thyroid or hepatic hypertrophy, natriuresis after a hypotonic saline load, growth inhibition or anesthetic effects. In equimolar doses amphenone B has all of these actions. Su 4885 ditartrate, however, increased the sensitivity to insulin. 2 units/kg of regular insulin, given subcutaneously to 7 rats which had received 300 mg/kg of Su 4885 b.i.d. orally, resulted in convulsions and in a mean decrease of 87% in fasting blood sugar. 17 insulin-treated control animals showed a 25% fall in blood sugar, and no convulsions. The mechanism of this effect is undetermined.

(*C*) *In vitro.*—Su 4885 ditartrate suppressed the output of Silber-Porter reacting steroids when applied *in vitro* with ACTH to rat, guinea pig, or dog adrenal slices at a concentration of 200 mg/l. Under similar conditions Amphenone B acts on the rat but not the guinea pig adrenals. Paper chromatograms of steroid fractions indicated that production of all reducing steroids was blocked by Su 4885. A dose-response curve for rat adrenals showed that 50% inhibition was achieved with approximately 50 mg/l (0·095 mM).

[1] M. J. Allen and A. H. Corwin, J. Amer. chem. Soc. *72*, 117 (1950).

[2] W. L. Bencze and M. J. Allen, J. organ. Chem. *22*, 352 (1957). – J. Korman and E. C. Olson, J. organ. Chem. *22*, 870 (1957).

[3] M. J. Allen, R. Hertz, and W. W. Tullner, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *74*, 632 (1950). – R. Hertz, M. J. Allen, and W. W. Tullner, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *75*, 627 (1950). – R. Hertz, W. W. Tullner, and M. J. Allen, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *77*, 480 (1951). – R. Hertz, M. J. Allen, W. W. Tullner, and B. R. Westfall, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *79*, 42 (1952). – A. E. Heming, D. E. Holtkamp, J. F. Kerwin, L. F. Mansor, and J. G. Decanay, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *80*, 154 (1952). – J. R. Hogness, R. H. Williams, and M. Lance, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *79*, 43 (1952). – R. Hertz, W. W. Tullner, J. A. Schricker, F. G. Dhyse, and L. F. Hallman, *Recent Progress in Hormone Research*, vol. 11 (New York 1955), p. 119. – W. W. Tullner, M. M. Graff, and R. Hertz, Endocrinology *58*, 802 (1956). – R. Hertz, J. A. Pittman, and M. M. Graff, J. clin. Endocrinol. Metab. *16*, 705 (1956). – G. W. Thorn, A. E. Renold, A. Goldfien, D. H. Nelson, W. J. Reddy, and R. Hertz, New England J. Med. *254*, 547 (1956). – A. E. Renold, J. Crabbe, L. Hernando-Avendano, D. H. Nelson, E. J. Ross, K. Emerson, Jr., and G. W. Thorn, New England J. Med. *256*, 16 (1957). – R. S. Mach and A. F. Müller, Schweiz. med. Wschr. Supplement *14*, 406 (1957).

[4] M. J. Allen, J. organ. Chem. *15*, 435 (1950),

[5] D. M. Hume and D. H. Nelson, *Surgical Forum* (40th), Clin. Congress Amer. College Surgeons (Philadelphia, 1955).

[6] R. H. Silber and R. D. Busch, J. clin. Endocrinol. Metab. *16*, 1333 (1956).

[7] J. Nichols and H. L. Sheehan, Endocrinology *51*, 362 (1952).

	No. Dogs	Hydrocortisone Equivalents	
		μg/ml	μg/2 min
Normal ± S. D. with Conf. limits, P = 0·01 . .	86	3·6 ± 1·8 (4·12 — 3·12)	14·0 ± 6·5 (15·81 — 12·15)
Su 4885 ± S. D. with Conf. limits, P = 0,01 . .	6	1·1 ± 0·8 (2·37 — 0)	4·6 ± 2·9 (9·44 — 0)

(*D*) *Other Endocrine Actions.*—Su 4885 (free base-subcutaneous) was not progestational at 50 mg/kg/day when tested according to the Clauberg technique in rabbits. Neither did it affect the weights of seminal vesicles, testes or uteri in rats in doses of 30–130 mg/kg when given orally or subcutaneously for 3–5 days.

J. J. Chart, H. Sheppard, M. J. Allen, W. L. Bencze, and R. Gaunt

Research Department, CIBA Pharmaceutical Products Inc., Summit (N. J.), December 24, 1957.

Zusammenfassung

2-Methyl-1,2-bis-(3-pyridyl)-1-propanon (Su 4885) hemmt beim Hund die Ausscheidung von 17-OH-Steroiden aus den Nebennieren und hemmt *in vitro* ähnlich wie Amphenon den ACTH-Effekt auf Ratten-, Meerschweinchen- und Hunde-Nebennieren. *In situ* bei der Ratte hat es jedoch keine Amphenon-Wirkung, von dem es sich auch sonst unterscheidet.

Stress Response of Leucocytes in Hypothyroid Rats

The relations between adrenal and thyroid glands occupy an important place in the hormonal regulations of the organism. The great part of them has the character of antagonistic influence on various functions[1]. However, the intimate relationship between these two glands remains on the whole unresolved.

We examined the influence of thyroid on the regulation of nonspecific stress response of leucocytes in rats by means of competitive inhibition of thyroid function. In distinction from the majority of experiments using thyroidectomy or strumigen feeding, we applied low doses of dried thyroid gland in order to cause hypofunction of the thyroid gland. Each of a group of white rats, males (n = 30), was given a daily dose of 20 mg dried thyroid gland (Thyreoidin SPOFA). The mean weight of this group (210 g) fell to 180 g after 36 days feeding. The mortality was 10%. The feeding by thyroid gland was stopped on the 37th day and the rats were kept for the next 7 days on normal food. During this period, the weight reached the level of the control non-treated group (n = 30) kept on normal diet. On the 8th day after the stopping of thyroid feeding, 6 of treated animals and 8 of the control group were killed and the thyroid, thymus and spleen were examined histologically. At the same time the leucocytes number and differential count were determined. The histological examination of thyroid in the treated group revealed the lowering and occasionnally the degeneration of follicular epithelium (Fig. 1 and 2). The histological picture of the thymus and the spleen were essentially the same as in the control group. In the peripheral blood, no important differences were found in the total number of leucocytes (M = 8500), neutrophils (M = 3000), lymphocytes (M = 5500) and eosinophils (M = 370).

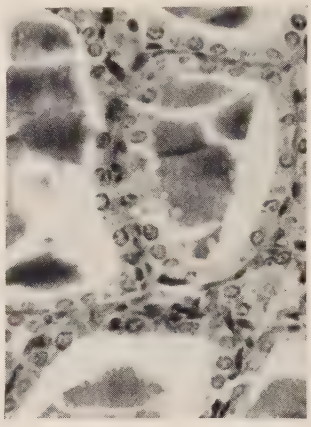


Fig. 1.—Thyroid of the control non-stressed rat. × 340.

The rest of the treated and control animals was given the intramuscular formaldehyde injection (0·5 ml 4%) and the animals were killed after 3 h (2 + 2), 6 h (2 + 2), 12 h (2 + 2), 24 h, (8 + 8) and 48 h (8 + 8). The blood leucocytes, thymus, and spleen were examined. The graphs illustrate the changes of neutrophils, lymphocytes and eosinophils. The stress deviations of the mean values are expressed in % of the mean initial value (= 100%) of the non-stressed animals. The statistical significance of the differences in the course of the stress response was determined by T test from the differences of the absolute values.

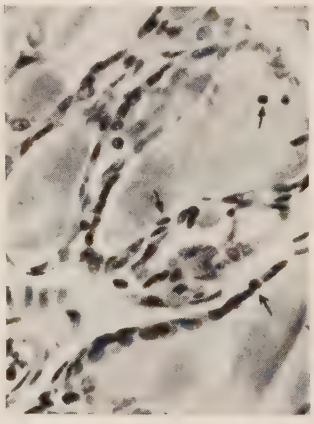


Fig. 2.—Thyroid of the non-stressed rat from the group feeded on thyroid gland before the beginning of the experiment. Follicular epithelium is lowered and occasionally degenerated (→). × 340.

Figure 3 shows the changes of neutrophils, and Figure 4 the changes of lymphocytes and eosinophils during the stress. The stressed control animals exhibit the changes typical for Selye's alarm reaction. The group with thyroid

[1] A. Albert, Ann. Rev. Physiol. *14*, 481 (1952).

hypofunction is distinguished by the following characteristic differences. The initial neutrophils peak was supressed without any influence on lymphopenia and eosinopenia, and in the same way the lymphocytes and eosinophils increase was inhibited in the subsequent intervals. Therefore the hypofunction of the thyroid seems not to influence the lymphopenic and the eosinopenic phase of the stress. However, it is not possible to draw any definitive conclusion from a small number of animals killed at intervals. But the inhibition of the increase of neutrophils, lymphocytes and eosinophils was proved very definitely.

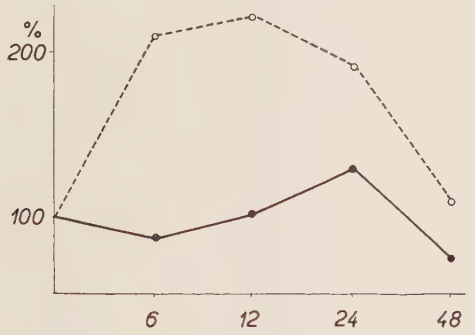


Fig. 3. – The stress changes of neutrophils in the control group (interrupted line) and in the hypothyroid group (full line). The ordinate shows the leucocytes deviation in %, the abscissa indicates the time of examination in hours after the evocation of stress.

The differences were statistically significant. $P < 0{\cdot}02$ expresses the significance of differences in neutrophils comprising the values of 6th and 12th h; $P < 0{\cdot}02$ denotes the significant difference of lymphocytes of both group comprising the values of the 12th and 24th h; $P < 0{\cdot}01$ denotes the significance of differences of eosinophils at 24th h.

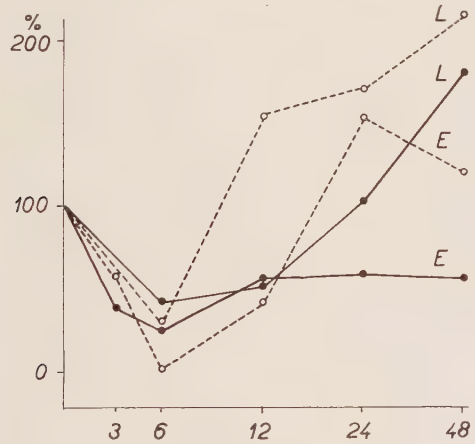


Fig. 4. – The stress changes of lymphocytes (L) and eosinophils (E) in the control group (interrupted line) and in the hypothyroid group (full line), expressed in % of the mean initial value.

There were no differences in the degree of lymphocytes fragmentation between the control and hypothyroid group in the thymus. In the spleen of the control rats, the fragmentation of lymphocytes was followed by the rise of activity in secondary lymph nodules as judged by the characteristics of their light centres[2]. In contract to this the spleen of hypothyroid rats showed much less intensity of lymphocytes fragmentation, and the successive rise in the activity of centres was absent. In this connection it is necessary to mention the studies by Gyllensten in which the lymphatic hyperplasia in the guinea pigs was evoced by thyroxine[3].

We may conclude that the rats with lowered function of thyroid gland after chronic thyroid feeding show deviation in the stress response of leucocytes. This deviation manifested itself in the prevention of increase of neutrophils, lymphocytes and eosinophils. The rise of activity in secondary nodules of the spleen was also inhibited.

M. Pospíšil and M. Hill

Biophysical Institute of the Academy of Sciences and Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Brno (Czechoslovakia), January 30, 1958.

Zusammenfassung

Nach Formalininjektion zeigen mit getrockneter Schilddrüse gefütterte Ratten eine Abweichung der peripheren Leukocytenreaktion. Bei so behandelten Ratten mit Schilddrüsenhypofunktion ist die Vermehrung der Neutrophilen, die Lymphocytose und die Eosinophilie gehemmt. Auch die histologische Kontrolle ergab eine Hemmung der transitorischen Aktivitätssteigerung des lymphoretikulären Milzgewebes.

[2] M. Hill and M. Pospíšil, to be published, 1958.

[3] L. Gyllensten, Acta Anatomica 17, Suppl. 18, 1 (1953).

Zur Biogenese pentazyklischer Triterpene in einer höheren Pflanze

Die Gültigkeit der Squalenhypothese bei der Biogenese von Cholesterin und anderen Steroiden (Zymosterin, Ergosterin u.a.), sowie von tetrazyklischen Triterpenen der Lanosteringruppe (Lanosterin und Eburicolsäure) bei Mikroorganismen, Pilzen und höheren Tieren ist durch zahlreiche Arbeiten von Bloch und anderen Autoren wiederholt bestätigt worden.

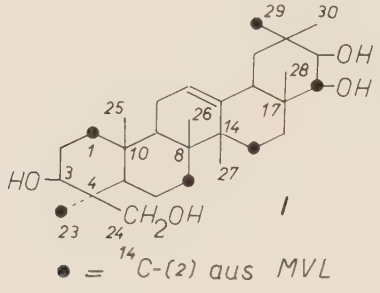
Alle diese tetrazyklischen Verbindungen sind durch einen weitgehend übereinstimmenden räumlichen Bau charakterisiert. Die Squalenhypothese wurde auch herangezogen zur Deutung der Biogenese der anderen, mit Lanosterin stereoisomeren tetrazyklischen Triterpengruppe (Tirucallol, Euphol u.a.), sowie der zahlreichen pentazyklischen Triterpenverbindungen, für die das Vorkommen im Pflanzenreich besonders charakteristisch ist[1].

Die Übertragung der Squalenhypothese auf diese Verbindungen, die zuerst auf einem Vergleich der verschiedenen Kohlenstoffgerüste beruhte[1] und die man später durch stereoelektronische Betrachtungen stützen konnte[2], wurde bisher noch nicht einer experimentellen Prüfung unterzogen. In der vorliegenden Mitteilung werden die ersten Ergebnisse einer in dieser Richtung unternommenen Arbeit beschrieben.

[1] L. Ruzicka, A. Eschenmoser und H. Heusser, Exper. *9*, 357 (1953).

[2] A. Eschenmoser, L. Ruzicka, O. Jeger und D. Arigoni, Helv. chim. Acta *38*, 1890 (1955). – L. Ruzicka in A. Todd: *Perspectives in organic chemistry* (Interscience Publishers Inc., New York und London 1956), S. 265.

Am Beispiel der Sojabohne wurde die Bildung pentazyklischer Triterpene und von Sitosterin mit Hilfe von ^{14}C-markierten Ausgangsstoffen verfolgt. Zur Untersuchung gelangten fünf Tage alte Keimlinge, denen man die ^{14}C-Substrate in Form einer verdünnten wässerigen Lösung verabreichte. Nach weiterem zehntägigen Wachstum wurde das Pflanzenmaterial (jeweils 20 g) getrocknet, zerrieben und in der üblichen Weise aufgearbeitet.



Dabei erhielt man durch chromatographische Trennung Sitosterin und die bekannten Sojasapogenole. Es sind dies Triterpenverbindungen, die bereits früher in das bekannte Δ^{12}-3β,24-Dihydroxy-oleanen übergeführt werden konnten[3].

Tabelle I

Substrate (als Na-Salze)	Sterine	Triterpene
0,1 m c CH_3–^{14}COOH	80 i p m/mg	78
0,1 m c $^{14}CH_3$–COOH	300	303
0,1 m c 2 ^{14}C–MVL	2500	2040

Die Ergebnisse von drei solchen Versuchen sind in Tabelle I enthalten. Daraus ist ersichtlich, dass sowohl Methyl- wie Carboxyl-markiertes Azetat am Aufbau des Oleanangerüstes beteiligt ist, wobei die Methylgruppe zu einer wesentlich höheren radioaktiven Ausbeute führt als das Carboxyl, wie schon bei Arbeiten mit Pilzen festgestellt wurde[4]. Die Mevalonsäure (IV) erwies sich noch um fast eine Zehnerpotenz der Methyl-markierten Essigsäure überlegen, in Analogie zu Beobachtungen bei der Cholesterin-Biogenese in Rattenleber-Homogenisaten[5]. Die weitgehende Übereinstimmung der spezifischen Aktivität der Sterin- und der Triterpen-Fraktion in allen drei Versuchen steht im Einklang mit der Hypothese der Entstehung dieser Verbindungen aus einer gemeinsamen Zwischenstufe, dem Squalen. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass Squalen in den unverseifbaren Anteilen verschiedener Pflanzenöle schon vor einiger Zeit nachgewiesen wurde[6]. Die dem Squalen entsprechenden chromatographischen Fraktionen erwiesen sich in den oben beschriebenen Versuchen als radioaktiv, konnten aber bisher wegen der geringen Substanzmengen nicht einwandfrei charakterisiert werden.

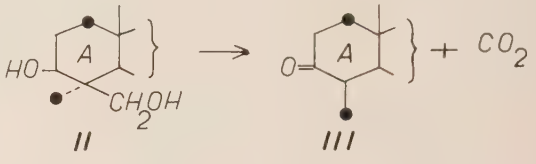
[3] A. Meyer, O. Jeger und L. Ruzicka, Helv. chim. Acta *33*, 672, 687, 1835 (1950).

[4] W. G. Dauben, Y. Ban und J. H. Richards, J. Amer. chem. Soc. *79*, 968 (1957).

[5] P. A. Tavormina, M. H. Gibbs und J. W. Huff, J. Amer. chem. Soc. *78*, 4498 (1956).

[6] W. Dickhart, Amer. J. Pharm. *127*, 359 (1955).

Was die Verteilung der Radioaktivität anbelangt, soll vorläufig nur über die mit 2-^{14}C-markierter Mevalonsäure erzielten Resultate berichtet werden. Die erhaltenen Sapogenole wurden nach Kuhn-Roth zu Essigsäure oxydiert und letztere nach Schmidt zu Kohlendioxyd und Methylamin abgebaut. Letzteres oxydierte man mit Permanganat zu Kohlendioxyd. Die in der Tabelle II zusammengestellten Werte zeigen, dass die C-Atome 4, 8, 10,



14, 17 und 20 (insofern sie durch die Abbaumethode gefasst werden) praktisch frei von Radioaktivität sind. Der Wert für die Aktivität der Methylgruppe in der erhaltenen Essigsäure ist in Übereinstimmung mit demjenigen, den man – unter Zugrundelegung der Squalenhypothese und Beachtung des im Falle von Squalen und Cholesterin von anderen Autoren nachgewiesenen Kondensationsschemas der Mevalonsäure[7] – für die Anwesenheit zweier markierter C-Atome in Stellung 23 und 29 (bzw. 30) berechnen kann[8].

Tabelle II

	Gefunden* ipm/mgC	Ber. nach Squalenhypothese
Sojasapogenol A	73,5 ± 3	—
CH_3 23 25 26 27 28 29	83,5 ± 6	91,5
COOH 4 10 8 14 17 20	6,7 ± 6	0

Von besonderem Interesse ist der Befund, dass das axial angeordnete C(24) keine Aktivität trägt (vg. Tabelle III, sowie die Formeln II und III) und somit der ursprünglichen Methylgruppe der Mevalonsäure entspre-

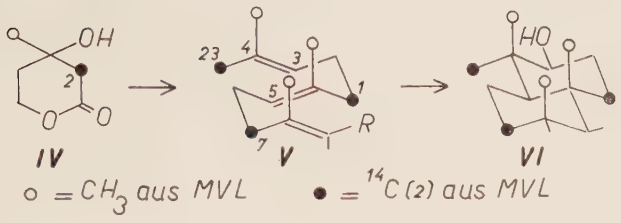
Tabelle III

	Gefunden ipm/mgC	Berechnet
Sojasapogenol D	73,5 ± 3	—
Nor-Keton	76,5 ± 3	76
CO_2 aus C(24)	12,5 ± 6	0 bzw. 183

[7] J. W. Cornforth, R. M. Cornforth, G. Popjak und J. Youhotsky-Gore, Biochem. J. *66*, 108 (1957). – B. H. Amdur, H. Rilling und K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. *79* 2646 (1957). – A. Dituri, S. Gurin und J. L. Rabinowitz, J. Amer. chem. Soc. *79*, 2650 (1957). – O. Isler, R. Rüegg, J. Würsch, K. F. Gey und A. Pletscher, Chimia *11*, 167 (1957). – E. C. Grob, Chimia *11*, 338 (1957). – A. J. Birch, R. J. English, R. A. Massy-Westropp und H. Smith, Proc. chem. Soc. *1957*, 273.

[8] Vgl. Formel I, worin die Lage der 1,2-Glykolgruppierung noch genauer überprüft werden muss. Die anderen vier C-Atome (1, 7, 15 und 22), die nach dem erwähnten Kondensationsschema aus Mevalonsäure radioaktiv sein müssen, werden beim Abbau nach Kuhn-Roth nicht erfasst.

* Gemessen als CO_2 im Proportional-Zählrohr.



chen muss. Dieses Resultat, welches nicht *a priori* vorausgesagt werden konnte, lässt an und für sich verschiedene Deutungen zu. Im Rahmen der biogenetischen Isoprenregel muss man aber daraus schliessen, dass beim Übergang von Mevalonsäure in Squalen die Decarboxylierung und Wasserabspaltung sterisch streng kontrolliert sind, und dass dadurch in den beiden endständigen Isopreneinheiten des Squalens lediglich eine Methylgruppe markiert ist, nämlich diejenige, die *cis*-ständig zum Wasserstoff am C(3) der Doppelbindung (Formel V) steht. Daraus folgt ferner, dass die Zyklisation zum Ring A ebenfalls streng stereospezifisch und in Sesselfaltung stattfinden muss (vgl. Schema V → VI).

Die mitgeteilten Resultate können als eine erste experimentelle Stütze der biogenetischen Isoprenregel bei pflanzlichen Triterpenen bewertet werden.

Über weitere experimentelle Einzelheiten wird an anderer Stelle ausführlich berichtet werden.

Diese Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds unterstützt. Ich danke PD Dr. H. Kern und Obergärtner Humm (Botanisches Institut der ETH) für ihre wertvolle Hilfe bei den Keimungsversuchen, ferner Dr. W. Küng für die Ausführung radioaktiver Messungen und schliesslich Prof. L. Ruzicka für die Anregung zu diesen Versuchen. Dr. O. Isler verdanke ich die verwendete Mevalonsäure.

D. Arigoni

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, 10. März 1958.

Summary

The biosynthesis of pentacyclic triterpenes has been followed in germinating soja-beans with the aid of isotopic tracers.

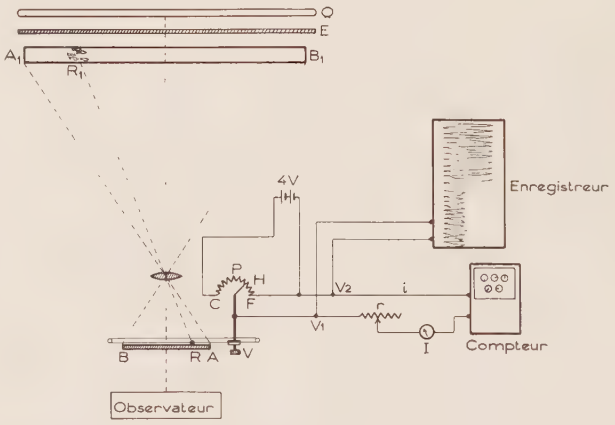
PRO LABORATORIO

Un dispositif sensible pour la mesure rapide d'attractions et de répulsions tropistiques chez des animaux grégaires

Pour mesurer des attractions et des répulsions tropistiques (phototropisme, chimiotropisme) Viaud[1] a indiqué une méthode basée sur la mesure des déplacements du centre de gravité (C.G.) de groupes d'animaux. En plaçant un certain nombre d'animaux d'une espèce donnée au milieu d'un long tube cylindrique, il a constaté que la position du C.G. de la population, malgré les déplacements en tous sens des individus, ne change presque pas au cours du temps et se trouve au milieu du tube. Sous l'influence d'un stimulus agissant par un bout du tube, le C.G. momentané se déplace et oscille autour d'une nouvelle position et la distance entre cette nouvelle position et le milieu du tube mesure l'action attractive ou répulsive du stimulus.

Dans la pratique cette méthode consiste à prendre à des intervalles de temps réguliers des photographies instantanées de la position des animaux dans le tube, de déterminer sur chaque cliché le C.G. momentané, puis de calculer la moyenne des positions du C.G. pour chaque condition de stimulation.

Cette méthode de Viaud s'applique aussi bien à des groupes d'animaux grégaires qu'à des animaux non grégaires. Dans le premier cas on peut cependant simplifier la méthode et la rendre beaucoup plus rapide en substituant aux nombreuses photographies un intégrateur électrique donnant automatiquement le déplacement moyen du C.G. Il nous a été ainsi possible de réaliser un nouveau dispositif que nous allons décrire et qui nous a servi surtout pour la mesure d'attractions et de répulsions tropistiques de poissons grégaires (*Rhodeus amarus* B).



Dispositif pour la mesure d'attractions et de répulsions tropistiques. Coupe horizontale.

Une cuve en verre A_1 B_1 (v. Figure) de longueur (70 cm) très grande par rapport aux autres dimensions (7 et 7 cm) contenant un groupe de 5 poissons grégaires, est éclairée uniformement par un écran diffuseur E à l'aide d'une lampe en tube Q. Au moyen d'une lentille L on projette l'image de la cuve sur un écran semi-transparent AB. Le long de cet écran on peut glisser un index mobile vertical R à l'aide d'un bouton tournant V. L'observateur suivra toujours les déplacements apparents de la position du C.G. (R_1) en manœuvrant cet index. Cette opération est très aisée puisque les poissons forment un groupe qui occupe toujours un petit espace dans la cuve, de façon qu'on peut facilement localiser visuellement le C.G. du groupe.

[1] G. Viaud, *Recherches expérimentales sur les Phototropisme des Daphnies* (Thèse, Strasbourg 1938); Behaviour *2*, 163 (1950).

Sur l'axe du bouton de commande V est fixé le curseur H d'un potentiomètre électrique P monté de façon telle que le courant qui passe par un ampèremètre I et un compteur électrique très sensible est proportionnel à la distance AR. Le courant est nul si l'index R coïncide avec l'image A de l'extrémité A_1 de la cuve. On transforme ainsi chaque distance $A_1 R_1$ du C.G. des poissons à l'extrémité A_1 de la cuve en un courant électrique d'intensité i de sorte que $A_1 R_1 = k \cdot i$.

Le compteur électrique sert à faire la somme des courants d'intensité i variables pendant le temps t que dure l'expérience; somme que nous appelerons n. Elle est donné directement par la lecture du cadran du compteur L'expression n/t est la valeur moyenne des i pendant le temps t, en conséquence elle est aussi, puisque $A_1 R_1 = k \cdot i$ la mesure de la moyenne des distances $A_1 R_1$ pendant ce temps. Elle donne donc directement la mesure de la position moyenne du C.G. à la face A_1 de la cuve.

S'il n'y a aucun stimulus dans la cuve les poissons nagent régulièrement d'un bout à l'autre et l'expérience montre que le C.G. moyen se place avec une erreur de quelques millimètres seulement toujours au milieu de la cuve, ce qui se traduit par $n_0/t = \text{const}$.

Par contre en plaçant un stimulus à un des bouts de l'aquarium on trouve, pour le même temps t, que le C.G. moyen se déplace; on obtient une autre valeur $n_1 = n_0$. Nous avons standardisé toutes nos mesures à 10 min, dans ce cas la différence $n_1 - n_0$ donne directement le deplacement du C.G. moyen par rapport au milieu de la cuve. Comme la valeur constante n_0 correspond à la distance (35 cm) du milieu de la cuve à une des extrémités, la différence $n_1 - n_0$ correspondra à un déplacement de

$$\frac{35\ (n_1 - n_0)}{n_0}\ \text{cm.}$$

Etalonnage. On détermine d'abord, sans l'aide des poissons, le nombre n_0 qui caractérise le milieu de la cuve en plaçant le curseur H en fin de course sur C et en faisant marcher le compteur pendant 10 min. Comme la valeur constante i du courant représente dans ce cas la longueur totale de la cuve, on lira sur le compteur un nombre $2\ n_0$ et c'est le nombre n_0 ainsi déterminé qui caractérise le milieu de la cuve.

D'une expérience à l'autre ce nombre $2\ n_0$ n'est constant que si i est constant ce qu'on vérifie à l'aide de l'ampèremètre I, et si la source qui alimente le potentiomètre a varié, on corrige i à l'aide du rhéostat r.

Dans certains cas il peut être utile de posséder des enregistrements des déplacements des animaux dans la cuve. On peut alors, comme il est visible sur la Figure, brancher entre V_1 et V_2 un voltmètre enregistreur.

E. Heintz

Laboratoire de Psychologie Animale, Institut de Zoologie et de Biologie Générale de l'Université de Strasbourg, le 20 décembre 1957.

Zusammenfassung

Nach der Methode von Viaud zur Bestimmung der Verschiebung des Schwerpunktes von Tiergruppen unter dem Einfluss eines Stimulus, wird eine neue Apparatur beschrieben, die gestattet, die Abstossung oder die Anziehung bei Schwarm oder Gruppen bildenden Formen (animaux grégaires) rasch und genau zu messen. Die Apparatur funktioniert halbautomatisch, und die mittlere Verschiebung des Schwerpunktes der Tiergruppe wird mit Hilfe einer elektrischen Integration direkt bestimmt.

Mesure du chimiotropisme de poissons grégaires avec un nouveau dispositif sensible

Dans la communication précédente[1] nous avons décrit un dispositif sensible et semi-automatique pour la mesure rapide d'attractions et de répulsions tropistiques chez des animaux grégaires. Dans ce qui suit, nous allons donner quelques exemples d'utilisation du dispositif avec indication de la précision obtenue.

Décrivons d'abord la marche générale d'une mesure de chimiotropisme faite sur des bouvières (*Rhodeus amarus* B.).

Supposons que nous ayons placé un groupe de 5 bouvières dans la cuve d'expérience. Comme ces animaux sont très grégaires ils se rassemblent très vite près d'une des deux parois formant la section de la cuve, parce qu'ils voient leur image dans cette paroi. Pour supprimer cet effet, il suffit de fixer sur les deux parois à l'intérieur de la cuve deux papiers-filtres identiques de dimensions égales à celles de la section de la cuve (7 × 7 cm). A partir de ce moment le groupe de bouvières nage très régulièrement d'un bout à l'autre de la cuve.

On met alors le compteur en marche (expérience témoin). A l'aide du bouton de commande V (v. la Figure de la note précédente) on suit avec l'index R continuellement la position variable du C.G. du groupe pendant 10 min. A ce moment on arrête le compteur qui indique n_0. Avec l'appareil que nous avons réalisé n_0 est dans la plupart des cas un nombre très voisin de 400. ($n_0 = 400$ correspondant d'après l'étalonnage au milieu de la cuve.) D'après notre expérience la précision obtenue sur dix mesures est de l'ordre de 400 ± 2, et d'après les nombreuses mesures que nous avons réalisées nous pouvons dire que l'erreur admissible sur une mesure est 400 ± 15.

C'est pourquoi, si dans une expérience témoin on trouve une valeur de n_0 supérieure à 415 ou inférieure à 385 nous considérons que la cuve n'est pas propre. Les bouvières sont extrêmement sensibles à de très petites quantités de substances chimiques. Il faut donc toujours nettoyer soigneusement la cuve après chaque expérience faite avec un stimulus chimique.

Après cette expérience-témoin on enlève un des papiers-filtre en le remplaçant par un autre imprégné de 1 cm³ de la solution titrée contenant la substance dont on veut connaître l'action sur les bouvières. Les opérations à faire sont alors les mêmes que dans l'expérience-témoin. Mettre le compteur en marche et suivre le C.G. pendant 10 min. Le compteur indique alors n_1 et, comme nous l'avons montré dans la note précédente[1], le rapport

$$\frac{35\ (n_1 - n_0)}{n_0}$$

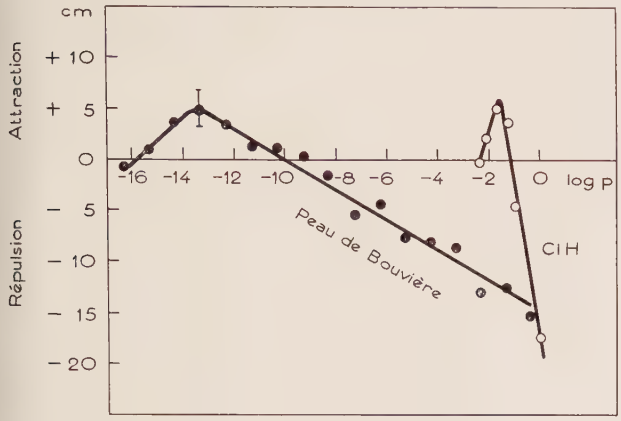
donnera le déplacement en cm du C.G. sous l'influence de la quantité de stimulus contenue dans 1 cm³ de solution.

Pour étudier l'action d'une autre quantité de stimulus, il faut vider la cuve, bien la nettoyer, refaire la mesure sur une population-témoin pour s'assurer que la cuve est bien propre.

Avec le dispositif décrit[1] nous avons étudié plus particulièrement le chimiotropisme des bouvières. Nous l'avons étudié avec diverses substances: Acide acétique, ClH, Pyridine et aussi avec la substance répulsive contenue dans la peau des bouvières (du type des «Schreckstoffe» de von Frisch).

[1] E. Heintz, Exper. *14*, 155 (1958).

Sur la Figure sont portés les résultats obtenus avec l'acide chlorhydrique et avec la peau de bouvières. En abscisses les logarithmes du poids du stimulus employé contenu dans le cm³ de solution imbibant le papier-filtre et en ordonnées les répulsions (ordonnées négatives) ou les attractions (ordonnées +) obtenues.



Chimiotropisme des bouvières. Attractions et répulsions en fonction du logarithme du poids p du stimulus employé: Peau de bouvière, ClH.

Dans les deux cas on voit qu'il y a répulsion pour les fortes concentrations du stimulus et attraction pour des concentrations plus faibles. En partant des concentrations liminaires et en faisant croître la concentration, on voit que la courbe passe par un maximum d'attraction.

Pour nous faire une idée de la précision des mesures nous avons marqué sur la Figure par un trait vertical la dispersion des valeurs mesurées en répétant l'expérience 10 fois avec un lot de 5 bouvières chaque fois pour log $p = -13{,}4$ (maximum de l'attraction).

La moyenne des 10 mesures x_1 a donné une attraction moyenne $\bar{x} = +4{,}82$ cm. Le calcul de l'erreur type sur la moyenne ($\sigma_{\bar{x}_1}$) a donné

$$\sigma_{\bar{x}_1} = \pm \sqrt{\frac{\Sigma (x_1 - \bar{x})^2}{n\,(n-1)}} = \pm \sqrt{\frac{8{,}4}{10{,}9}} = \pm 0{,}306 \text{ cm.}$$

Pour les 10 mesures témoins nous avons trouvé une position moyenne du C.G. décalée de $-0{,}11$ cm du milieu de la cuve avec erreur type sur la moyenne $\sigma_{\bar{x}_2} = \pm 0{,}155$ cm, écart non significatif.

La valeur moyenne de l'attraction réelle est égale à $4{,}82 + 0{,}11 = +4{,}93$ avec une erreur de

$$\sqrt{(\sigma_{\bar{x}_1})^2 + (\sigma_{\bar{x}_2})^2} = 0{,}343.$$

La valeur du test «t» de Student-Fisher (18 degrés de liberté) est alors $4{,}93/0{,}343 = 14{,}4$. L'attraction mesurée par la différence des moyennes est donc significative au seuil de 0,001.

Cet exemple montre que le dispositif décrit[1] est très précis et se prête bien à la mesure d'attractions et de répulsions chimiotropiques. On peut s'en servir aussi pour l'étude du phototropisme et aussi pour l'étude de la répulsion ou de l'attraction causée par d'autres facteurs physiques.

E. Heintz

Laboratoire de Psychologie Animale, Institut de Zoologie et de Biologie Générale de l'Université de Strasbourg, le 20 décembre 1957.

Zusammenfassung

Chemotaktische Messungen an Bitterlingen (*Rhodeus amarus* B.), die dem Einfluss verschiedener Mengen von Fischhaut und von ClH ausgesetzt waren, werden mit Angabe der Messgenauigkeit beschrieben.

PRO EXPERIMENTIS

Losses of Nucleic Acid Derivatives from Fixed Tissues during Flattening of Paraffin Sections on Water[1]

It is generally recognized that losses of proteins and carbohydrates may occur, if paraffin sections of freeze-dried tissues are flattened on water surfaces prior to the attachment to slides[2]. However, in sections from fixed tissues, either fresh or freeze-dried, mainly the carbohydrates should be affected; the possible release of protein and nucleic acid derivatives has largely been neglected, and no information seems available about losses actually observed. The present note demonstrates such losses from differently fixed and embedded rat pancreas.

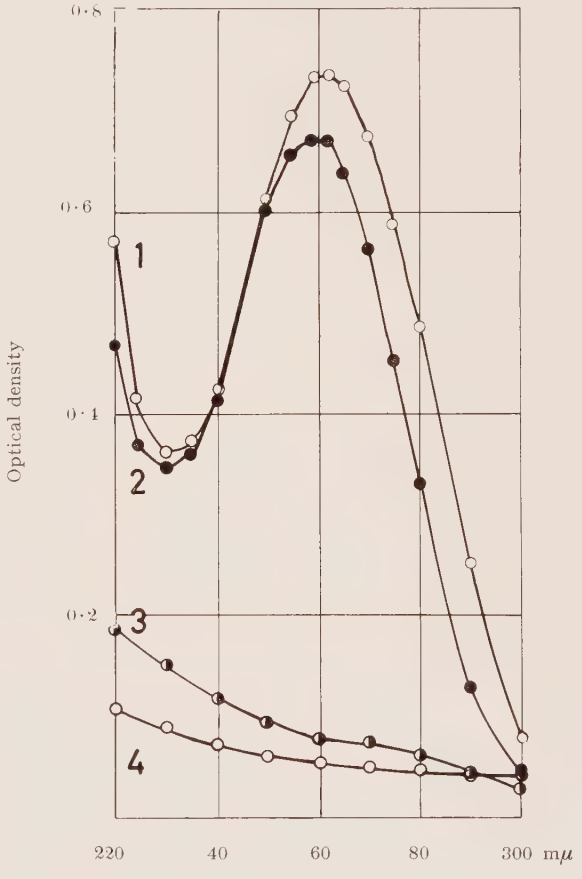


Fig. 1

[1] Aided by a grant from The Royal Physiographic Society, Lund.

[2] A. G. E. Pearse, *Histochemistry* (Churchill, London 1954) (with further references).

Experiments and Results. Small pieces of pancreas from rats were fixed in Carnoy's fluid for 1·5 h, either fresh or following freeze-drying, or, fresh, for 24 h in Lillie's buffered formaldehyde solution[3]. Dehydration followed in alcohol. Details of the procedures used were given

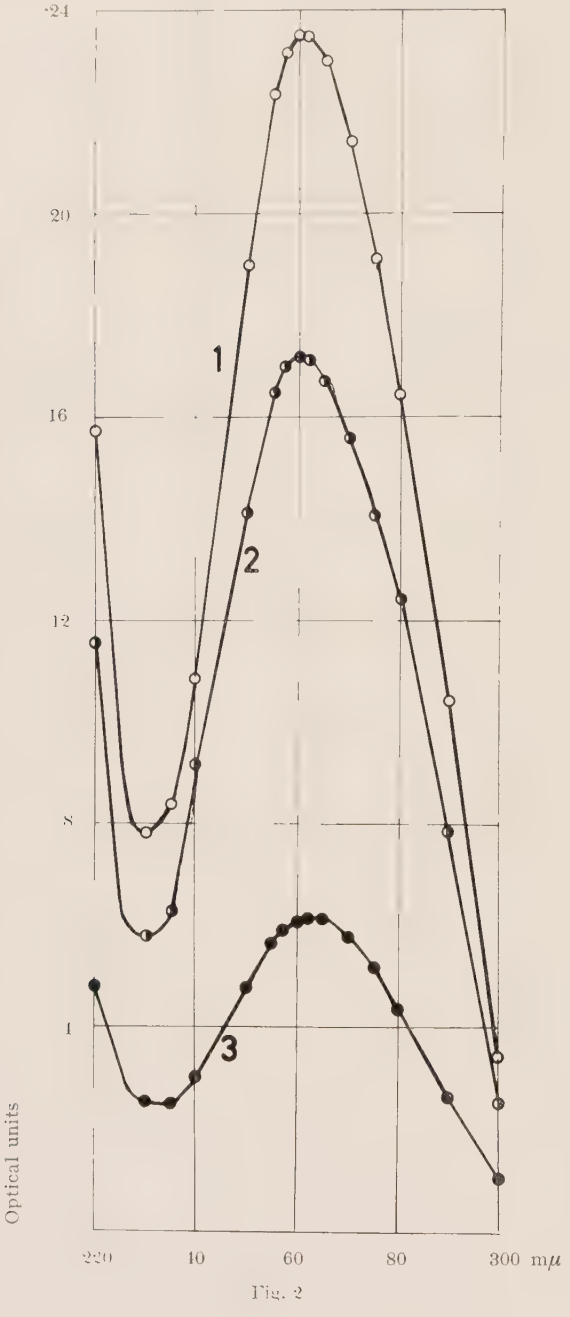


Fig. 2

recently[4]. The following alternative embedding techniques were employed: (1) Benzene for twice 20 min, molten paraffin for 2 h. (2) Methyl benzoate for 24 h, benzene and paraffin as above. (3) Petroleum ether for three times 2 h, embedding in paraffin *in vacuo*. The paraffin (M.P. 52°C) was kept at 56° ± 0·1°C, and solidified at ice-water temperature.

[3] R. D. Lillie, *Histopathologic Technic* (Blakiston, Philadelphia 1948).

[4] S. Lagerstedt, Z. Zellforsch. *45*, 472 (1957). – N. Jonsson and S. Lagerstedt, Exper. *13*, 321 (1957).

10 μ sections were distributed between glass-stoppered centrifuge tubes, each tube given the consecutive section. Without de-paraffination, the material was extracted with glass-redistilled water at 37° ± 0·01°C for 5, 10, 20 or 40 min, and the ultraviolet absorption measured in a Beckman Model DU spectrophotometer, using 10 mm cells. As shown in Figure 1, even 5 min extraction of freeze-dried (Curve 1) or fresh (Curve 2) Carnoy-fixed tissues released substances selectively absorbing around 260 mμ. Formaldehyde fixation largely prevented such losses (Curve 3). Curve 4 shows the non-specific absorption caused by the paraffin used for embedding. Increase of extraction time, or variation of embedding techniques did not influence these general results.

The water extracts were evaporated to dryness *in vacuo* at + 45°C, hydrolyzed with *N* HCl at 100°C for 1 h, and spots placed on Whatman No. 1 chromatographic paper. Development in *iso*-propanol/HCl/H_2O: 97/25/28, with a hydrolysate of yeast nucleic acid as reference, yielded four spots on the ultraviolet print: guanine, adenine, cytidylic and uridylic acid. They were further characterized through their absorption spectra. Ninhydrine spraying revealed some admixture of protein degradation products.

In about 30 experiments the losses observed were quantitatively determined, as shown in Figure 2. Curve 3 derives from a 10 min water extract, made up to normal with perchloric acid; Curve 2 from an extract of the same sections after deparaffination with normal perchloric acid at room temperature for 2 h[4]; Curve 1 from a similar perchloric acid extract of a comparable sample of deparaffinized sections from the same block. The sum of the optical units released at 260 mμ for Curves 2 and 3 fits the value for Curve 1 fairly well. This total loss of about 25% of the initial amount was reached within 5 min and not significantly increased through 40 min extraction.

Extraction of paraffin sections with 70% ethanol, sometimes used as a substitute for water in flattening of sections, also caused losses of nucleotide material. Absolute ethanol, in itself, showed no extractive power, of course.

The above findings were verified, at least qualitatively, under the conditions of ordinary histotechniques. Paraffin sections floated on water of different temperatures were observed through binoculars, and the time necessary for complete flattening of the paraffin noted with a stopwatch. At 50°C the paraffin disintegrated quickly, leaving stretched sections; at 37° and 40° the paraffin flattened, but the sections still showed wrinkles; at 43°, 45° and 48° both paraffin and sections stretched satisfactorily. The results are summarized in Figure 3 for fresh Carnoy-fixed tissue, embedded *via* benzene. 16 sections of this material, 10μ thick and containing about 25 mm² of tissue each, were floated for 12 s on 2 ml of water at 45°C. Ultraviolet curves from the water corresponded exactly in type to Curves 1 and 2 in Figure 1. Quantitative estimation, using a slight modification of the method given above, demonstrated losses of about 6%.

Conclusions. Obviously, proteins and nucleic acid derivatives are not protected by the paraffin in paraffin sections from extraction by water during the histotechnical flattening procedure. It seems probable, in the material tested, that maximum extraction is accomplished rather quickly (25% after 5 or 40 min), and that flattening performed even under optimal conditions (12 s at 45°C) will not prevent from such losses. Thus, in critical histochemical work, the stretching on water surfaces must be avoided, or, at least, the effect carefully controlled for each tissue and fixative used. Since the formaldehyde

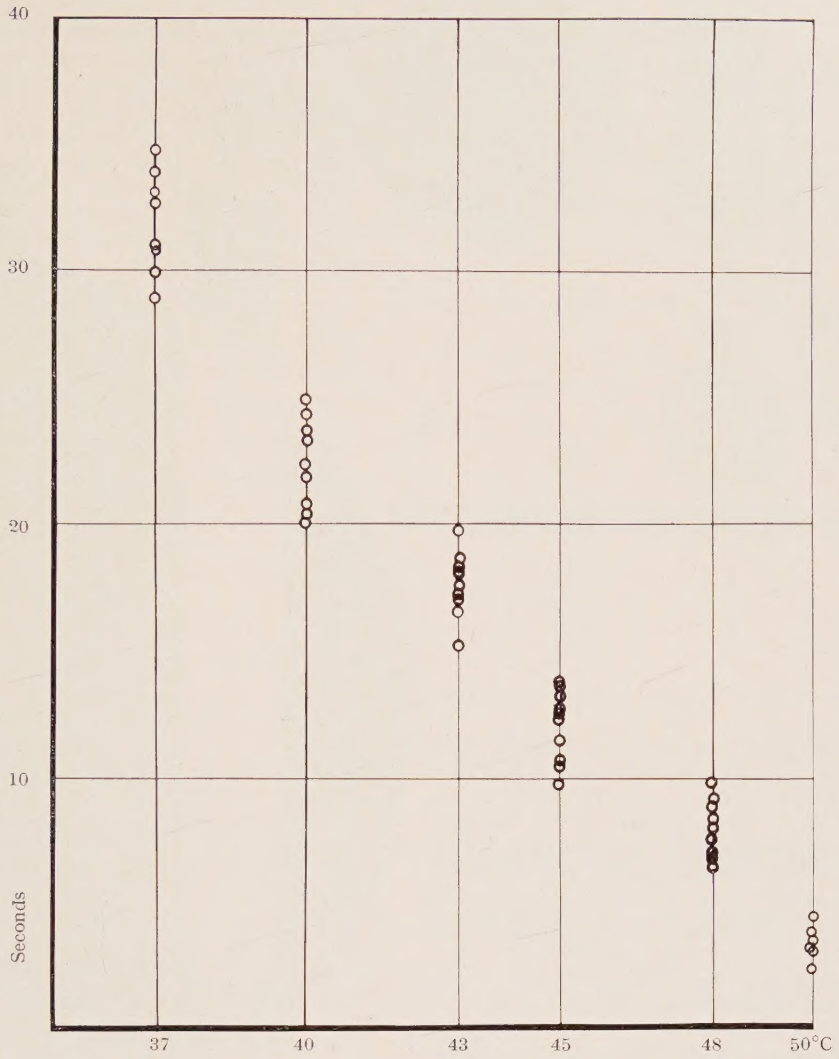


Fig. 3

fixative itself extracts nucleotide material[4], this method seems largely unsuitable. Consequently, the preparation of microtome sections of fresh-frozen tissue[5] in recent modifications[6], or mounting of the sections on slides without using water, has to be adopted.

N. Jonsson and S. Lagerstedt

Department of Histology, University of Lund (Sweden), November 5, 1957.

Zusammenfassung

Aus fixiertem Gewebe bzw. Paraffinschnitten, die mit normaler Technik auf Wasser ausgebreitet werden, gelingt es, Nukleotide und Eiweissderivate zu extrahieren. Quantitative Daten werden mitgeteilt, und es wird deren Bedeutung für die Histochemie diskutiert.

[5] K. Linderstrøm-Lang and K. R. Mogensen, C. R. trav. lab. Carlsberg Sér. Chim. *23*, 27 (1938).

[6] B. W. Grunbaum, J. R. Geary, Jr., and D. Glick, J. Histochem. Cytochem. *4*, 555 (1956). – W. Thornburg and P. E. Mengers, J. Histochem. Cytochem. *5*, 47 (1957).

PRO EXPERIMENTIS

Adaptation of the Methyl Orange Method for the Determination of Reserpine*

The method proposed in the present paper represents an adaptation of a general reaction for organic bases developed by Brodie and Udenfriend[1], and has the advantages over previous methods[2] of being simple, rapid, and applicable to both pharmaceutical preparations and biological materials. Reserpine is extracted from slightly acidic solutions (pH adjusted to between 4–6 with 0·1 N HCl) with five times as much ethylene dichloride (the solvent phase is washed with an equal volume of 0·1 N sodium hydroxide), and then reacted

* A grant for this study, and the reserpine used in these experiments, were generously supplied by Ciba Pharmaceutical Products, Inc., Summit, New Jersey.

[1] B. B. Brodie and S. Udenfriend, J. biol. Chem. *158*, 705 (1945).

[2] S. M. Hess, P. A. Shore, and B. B. Brodie, J. Pharmacol. *118*, 84 (1956). – A. J. Glazko, W. A. Dill, L. M. Wolf, and A. J. Kazenko, Pharmacol. *118*, 377 (1957). – R. B. Poet and J. M. Kelley, 126th National Meeting of the A.C.S., Division of Biological Chemistry, New York (September 1954).

with methyl orange to form a soluble complex in the organic solvent. Color is then developed by the addition of acid alcohol. The details of the technique are otherwise essentially as described in the original article[1].

Results and Discussion.—Reserpine-methyl orange colored complex has a maximum absorption peak ranging from 521 to 535 millimicrons. Selection of the midpoint of this plateau gives the most reproducible results in analysis.

Table I
Effect of time on the optical density of the reserpine-methyl orange complex.

Elapsed time in minutes	Optical density
5	0·310
10	0·312
20	0·309
40	0·308
60	0·310
120	0·310
240	0·310
480	0·309
640	0·310

Table I shows the effect of time on the optical density of the final colored reserpine-methyl orange complex. Color development is apparently complete within 5 min after the addition of the acid alcohol and is stable at room temperatures for at least 8 h. Optical density of the color is proportional to concentrations of reserpine in ethylene dichloride ranging from 0·3 to 15 μg/ml; the maximum values corresponding to an optical density at the upper limit of sensitivity of the colorimeter.

Although varying losses occur with changes in the pH of the medium from which reserpine is extracted, over 92% recoveries are possible between a pH of 4 and 8. Table II shows the effect of pH on the recovery of reserpine from plasma. When the pH of the medium was set at 4–6, recoveries generally ranged from 92–96%. Representative figures for tissue homogenates, plasma, urine, aqueous solutions, and tablets are presented in Table III. In all cases, blanks were low, corresponding to less than 0·05 μg of reserpine per ml of ethylene dichloride.

Table II
Effect of pH on recovery of reserpine from plasma[1]

pH	μg reserpine added	μg reserpine per ml	Percentage[2] reserpine recovered
1·0	25·0	2·5	89·0 ± 2·4
4·0	25·0	2·5	95·5 ± 1·9
6·0	25·0	2·5	95·8 ± 2·6
8·0	25·0	2·5	94·0 ± 3·3
11·0	25·0	2·5	90·0 ± 3·0

Of several sulfonic acids, methyl orange proved to be the one of choice because it is a water soluble dye which is apparently insoluble in ethylene dichloride and has a high color index. It forms a reserpine-methyl orange complex which is very soluble in ethylene dichloride and enters the organic phase in amounts proportional to a wide range of concentrations of reserpine. Different lots of methyl orange produce slight but constant, variations in optical density for a given amount of reserpine although the absorption spectrum retains the small relative shape. Therefore, it is necessary to make a new standard curve for each new batch of methyl orange used. In this study, a standard was always run along with unknowns thereby eliminating this variable.

Table III
Recovery of reserpine with the pH of the medium set at 4–6.

Substance analysed	μg reserpine added	μg reserpine per ml	Percentage[3] reserpine recovered
Aqueous solutions	12·5	1·25	96·8 ± 2·6
	25·0	2·50	97·6 ± 2·1
Tablets	50·0	5·00	96·5 ± 1·8
	100·0	10·00	97·2 ± 1·5
Plasma	12·5	1·25	92·9 ± 2·9
	25·0	2·50	93·2 ± 3·3
Urine	12·5	1·25	93·5 ± 3·0
	25·0	2·50	94·8 ± 2·8
5% homogenate[4] .	12·5	1·25	92·8 ± 3·1
	25·0	2·50	93·6 ± 2·6

The proposed method has already been used to estimate the plasma disappearance of reserpine in the unanesthetized dog[5]. GLAZKO *et al.*[6] subsequently found also that the methyl orange method was suitable for determinations of reserpine and methyl reserpate; however, no data on the method appears in their article. Further possibilities remain that the methyl orange method for reserpine could also be used for studies concerning tissue metabolism of reserpine and, in combination with prior paper or column chromatography, to assay reserpine in various Rauwolfia species.

E. A. DE FELICE[7]

Biological Sciences, New England College of Pharmacy, Boston (Mass.), Dezember 3, 1957.

Résumé

Une méthode microcolorimétrique est proposée pour la détermination de la réserpine dans les préparations pharmaceutiques et le matériel biologique. La réserpine est extraite des solutions légèrement acides avec du dichlorure d'éthyle, puis est mélangé au méthyl orange pour former un complexe dans le solvent organique. La couleur se forme, par l'addition d'alcool acide, et elle est proportionnelle aux concentrations de réserpine allant de 0·3 à 15 μg/ml de dichlorure d'éthyle. En général on obtient des récupérations dépassant 92%. La méthode a été considérée comme applicable à des études concernant la disparition de la réserpine du protoplasme.

[1] Aqueous solutions, tablets, urine, and tissue homogenates give essentially the same results.

[2] Figures represent means ± standard deviations of ten consecutive determinations.

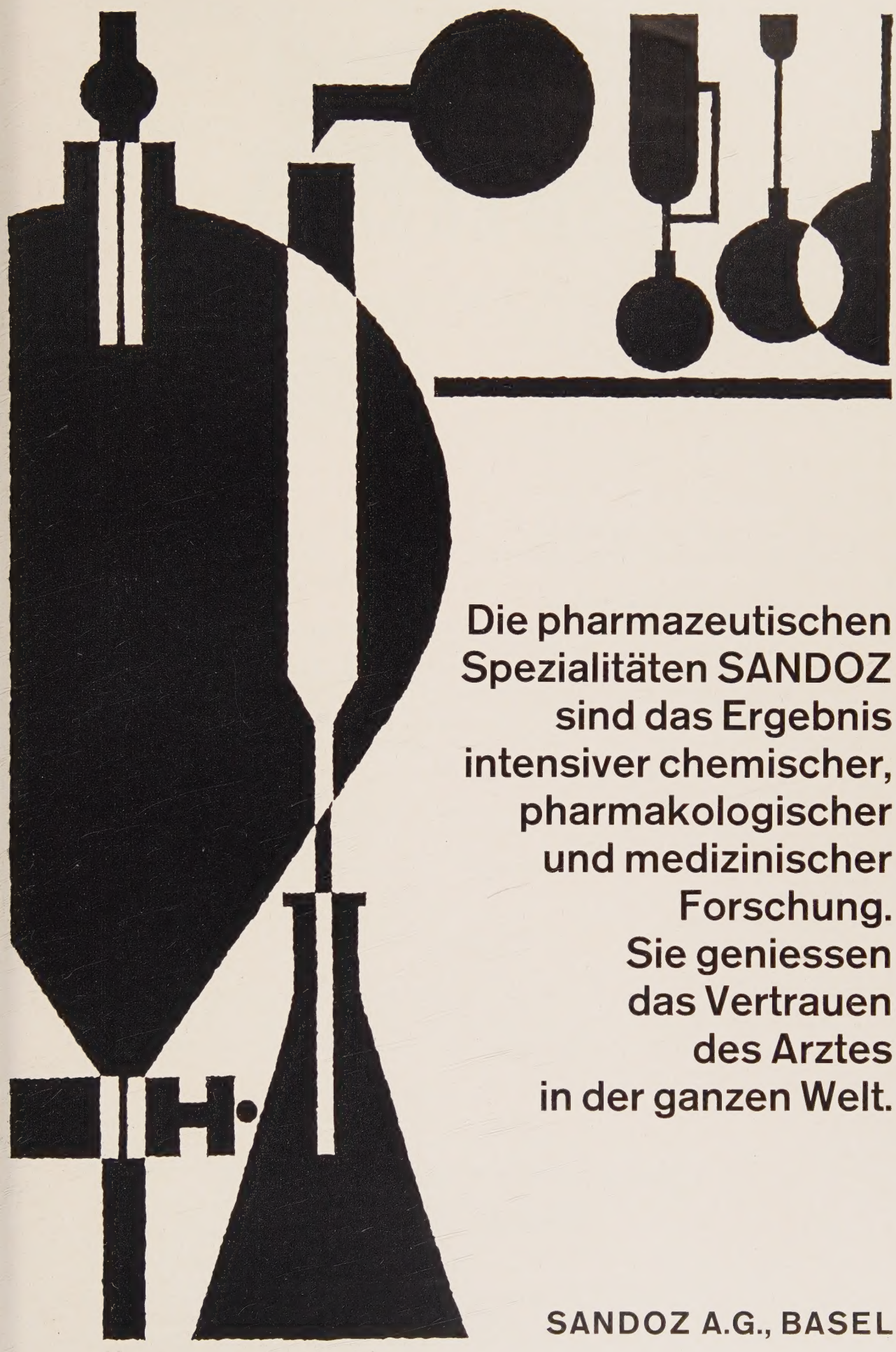
[3] Figures represent means ± standard deviations of ten consecutive determinations.

[4] 5% homogenates of dog liver, kidney, and spleen give essentially the same results.

[5] E. A. DE FELICE, Exper. *13*, 373 (1957).

[6] A. J. GLAZKO, W. A. DILL, L. M. WOLF, and A. J. KAZENKO, J. Pharmacol. *118*, 377 (1957).

[7] Preliminary aspects of this study were completed while the author was Ciba Fellow in Pharmacology at Boston University School of Medicine. Currently the author is Professor of Biological Science at the New England College of Pharmacy.



Die pharmazeutischen
Spezialitäten SANDOZ
sind das Ergebnis
intensiver chemischer,
pharmakologischer
und medizinischer
Forschung.
Sie geniessen
das Vertrauen
des Arztes
in der ganzen Welt.

SANDOZ A.G., BASEL

UNIVERSITAS

A German Review of the Arts and Sciences-Quarterly English Language Edition
Editor: Dr. H. Walter Bähr, Tübingen. Editorial board: H. W. Bähr und H. Rotta

Contents of Vol. 2, No. 1

Prof. Dr.-Ing. Eugen Sänger, Stuttgart
Space-Travel and the Exploration of Other Worlds

Prof. Dr. Joseph Gregor, Vienna
Richard Strauss
His Personality and His Music

Dr.-Ing. Alfred Siemens, Erlangen
Automation and Modern Industry

Prof. Dr. Otto Heinrich von der Gablentz, Berlin
Why is there no Western Ideology?

Prof. Dr. Max Steck, Munich
The Theoretical Basis of Albrecht Dürer's Painting

Prof. Dr. Oswald von Nell-Breuning, S. J., Frankfort o. M.
Human Values and Belief in God

Prof. Georg von Hevesy, Nobel prize winner, Stockholm
Path of Atoms through Generations

Prof. Dr. Martin Eisentraut, Bonn
Body-Temperature and its Regulation in Animals

Prof. Dr. Max Pfannenstiel, Freiburg
Modern Problems of Submarine Geology

Prof. Dr. André Pirson, Marburg
Atoms and Plants

UNIVERSITAS appears quarterly. Each issue contains 9–12 articles (112 pages). Annual subscription DM 16.80 $ 4.00 £ 1.8.7. Rs 19.0.0 excluding postage. Single copy DM 4.80 $ 1.10 £ 0.7.10 Rs 5.4.0 excluding postage. UNIVERSITAS can be obtained from all booksellers

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
Stuttgart Postfach 40